



Renata Sofia Araújo da Silva DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE
HPLC PARA A DETECÇÃO DE ADUCTOS DAS
CATECOLAMINAS COM A GSH EM AMOSTRAS
BIOLÓGICAS



Renata Sofia Araújo da Silva **DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE HPLC PARA A DETECÇÃO DE ADUCTOS DAS CATECOLAMINAS COM A GSH EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Fernando Remião, Professor Auxiliar do Departamento de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e co-orientação da Professora Doutora Paula Polónia, Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da Fundação para a Ciência e para a Tecnologia (FCT), no âmbito do Projecto POCI/SAU-OBS/55849/2004, designado por “Stress Oxidativo na Doença Cardíaca: Acção das Catecolaminas”, e do FEDER através do Programa POCI 2010.

Esta dissertação é dedicada,
com muito amor,
aos meus PAIS,
à minha irmã LILIANA
e ao NUNO

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Ana Dias Monteiro Santos
Professora Catedrática da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves
Professora Associada da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Fernando Manuel Gomes Remião
Professor Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Professora Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho
Professora Auxiliar da Universidade Fernando Pessoa

agradecimentos

Gostaria de deixar uma palavra de profunda gratidão a todos aqueles que, de uma forma directa ou indirecta, contribuíram para a realização deste trabalho. A execução de uma tese não é exclusivamente uma tarefa solitária. Para a sua concretização convergem inúmeras vontades que, num esforço colectivo, nos permitem chegar ao fim.

À Professora Maria de Lourdes Bastos, agradeço a oportunidade de integração no Laboratório de Toxicologia e a sua amizade e apoio científico. A sua dedicação e postura são prova viva que à frente de grandes descobertas e acontecimentos está sempre uma “Grande Mulher”.

Ao Professor Fernando Remião, orientador desta dissertação, agradeço a liberdade intelectual e o constante estímulo e coragem para superar as adversidades inerentes à realização desta etapa. Agradeço ainda a sua total disponibilidade, confiança e o apoio científico prestado. Acredito que as dificuldades por que passamos durante esta caminhada nos fazem valorizar e acreditar que, com esforço, é possível atingir os objectivos.

À Professora Maria Paula Polónia Gonçalves, co-orientadora desta dissertação, agradeço a disponibilidade demonstrada e a contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Professor Félix Dias Carvalho agradeço o entusiasmo e apoio científico prestado durante a realização deste trabalho.

À Engenheira Maria Elisa Soares, agradeço o papel de “Mãe do Porto”. A ela, do fundo do meu coração, agradeço o carinho, amor e preocupação constante e peço desculpa por, muitas vezes, não corresponder na mesma medida.

À Dr.^a Helena Carmo agradeço o apoio incansável e as noites passadas sem dormir a trabalhar na conclusão desta dissertação. Agradeço, também, o apoio científico prestado e o enorme carinho e amizade demonstrados. Por tudo isso “Thak you Boss”.

Aos meus coleguinhas do laboratório agradeço a enorme amizade e as longas horas de brincadeiras. A alegria ilumina a vida e os nossos bons momentos de animação ajudaram a ultrapassar todos os maus momentos.

Aos meus pais, agradeço pelos valores, pelos exemplos e pelo apoio incondicional na decisão de me dedicar à investigação. Sem o vosso apoio, moral e financeiro, este trabalho não teria sido possível. À Liana agradeço o incentivo para seguir os meus desejos e vontades.

Ao Nuno agradeço a paciência sem limites, a cumplicidade e o enorme amor. Agradeço, também, pelas palavras, pelo silêncio, pelo apoio e por ser capaz de compreender de uma forma impar o “sonho de uma vida”.

Aos amigos, o mais sincero agradecimento, pois sem vocês a vida vale muito pouco.

A quantidade de agradecimentos tem uma tendência a ser proporcional ao tempo do percurso. E quando este tempo se alonga, juntamente com os agradecimentos, devem vir algumas desculpas. Deste modo, termino pedindo desculpas a todos aqueles a quem eu me esqueci de agradecer.

palavras-chave

Catecolaminas, stress oxidativo, glutathione (GSH), HPLC, aductos, alumina, validação.

resumo

Introdução: Níveis elevados de catecolaminas circulantes podem conduzir a fenómenos de cardiotoxicidade e neurotoxicidade. A cardiotoxicidade pode surgir devido à sobrestimulação de receptores adrenérgicos embora existam evidências crescentes que apontam para um papel importante da oxidação das catecolaminas na ocorrência destes efeitos tóxicos. Também os efeitos neurotóxicos induzidos pela dopamina e pelos seus produtos de oxidação foram já considerados como intervenientes importantes na patofisiologia da doença de Parkinson. Estudos mecanísticos *in vitro* corroboram estas observações demonstrando que os produtos de oxidação das catecolaminas podem, posteriormente, sofrer conjugação com a GSH em cardiomiócitos e hepatócitos isolados de rato, resultando na formação de espécies de elevada toxicidade. A identificação e quantificação destas espécies reactivas em amostras biológicas é, deste modo, de extrema importância.

Objectivo e Métodos: Desenvolver uma metodologia de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a detecção de aductos das catecolaminas biogénicas, adrenalina, noradrenalina e dopamina, com a GSH em amostras biológicas. Para a síntese dos aductos foram efectuadas misturas reaccionais em soro humano contendo cada uma das catecolaminas em estudo (3,3 nM até 3,75 mM), tirosinase e GSH. Após 12 minutos de reacção, os aductos foram extraídos mediante adsorção na alumina. Foram injectadas alíquotas dos extractos obtidos num sistema de HPLC equipado com um detector de fotodíodos e um detector coulométrico. Foram utilizadas uma coluna Spherisorb S5 ODS2 e uma fase móvel eluída em modo isocrático, a fluxo de 1 mL/min, e constituída por metanol (2 a 10%, dependendo da catecolamina), ácido cítrico (50 mM) e ácido octanossulfónico (0,46 mM) com pH ajustado a 3,0. Os aductos mono- e bi-conjugados das catecolaminas com a GSH foram caracterizados de acordo com os seus espectros no ultravioleta. A posterior análise destes aductos por espectrometria de massa sustentou a sua identidade. Após a optimização das condições para a detecção e extracção destes compostos, foi validado o método para a detecção de aductos da adrenalina (ADR) com a GSH em amostras de soro humano.

Resultados/Discussão: Foi desenvolvida uma metodologia de HPLC em modo isocrático e em fase reversa com detecção por fotodíodos e/ou coulométrica, de forma a analisar os aductos de catecolaminas biogénicas com a GSH. Foi igualmente desenvolvido um procedimento de tratamento das amostras de soro humano para análise destes aductos. O método demonstrou possuir uma boa precisão [boa repetibilidade instrumental (CV <3%), boa repetibilidade do procedimento global (CV <5%) e boa precisão intermédia (CV <6%)]. Foi obtida uma resposta linear para concentrações de adrenalina entre 0 e 175 µM. O limite de detecção foi grandemente melhorado pelo processo de extracção (2 pmol e 0,066 pmol de ADR para o primeiro e segundo monoconjugado, respectivamente), enquadrando-se dentro dos níveis esperados de catecolaminas em determinadas condições patofisiológicas. As recuperações da extracção foram diferentes para os dois monoconjugados da ADR com a GSH (entre 51 e 93%, dependendo do aducto e da concentração de ADR testada). Em conclusão, o desenvolvimento desta metodologia permite a análise directa de aductos da adrenalina com a GSH em soro humano, demonstrando ser uma importante ferramenta analítica para o estudo do processo de oxidação das catecolaminas e da toxicidade associada a estes compostos.

keywords

Catecholamines, oxidative stress, glutathione (GSH), HPLC, adducts, alumina, validation.

abstract

Introduction: Sustained high levels of circulating catecholamines may lead to cardiotoxicity and neurotoxicity. Cardiotoxicity can occur via adrenoceptor overstimulation although increasing evidence also points toward an important role of the catecholamines oxidation in the induction of these toxic effects. Furthermore, neurotoxic effects induced by dopamine and its oxidation products are considered to be important factors contributing to the pathogenesis of Parkinson's disease. Mechanistic *in vitro* studies corroborate these findings since they have shown that the catecholamines oxidation products can further conjugate with GSH in isolated rat cardiomyocytes and hepatocytes leading to the formation of highly toxic species. The identification and quantification of these reactive species in biological samples is, thus, of utmost importance.

Aim and Methods: To develop an high performance liquid chromatography (HPLC) methodology for detection of GSH adducts of the biogenic catecholamines adrenaline, noradrenaline, and dopamine in biological samples. For the synthesis of the adducts reaction mixtures were made in human serum containing each catecholamine (3.3 nM up to 3.75 mM), tyrosinase and GSH. After 12 min of reaction, the adducts were extracted after adsorption to alumina. Aliquots of these extracts were injected into an HPLC system equipped with a photodiode array detector and a coulometer detector. A Spherisorb S5 ODS2 column and an isocratic mobile phase consisting of methanol (2 up to 10%, depending on the catecholamine), citric acid (50 mM) and octanesulfonic acid (0.46 mM) adjusted to pH 3.0 at a 1 mL/min flow rate were used. The mono- and bi-conjugates of catecholamines with GSH were characterized by their UV spectra. Further analysis by mass spectrometry of these adducts sustained their identity. After the optimization of all the conditions for the detection and extraction of these compounds, the method was validated for the detection of adrenaline (ADR) GSH adducts in human serum.

Results and Discussion: An isocratic reverse-phase HPLC method with photodiode array and/or coulometer detection was developed in order to analyse biogenic catecholamines-GSH adducts. A sample treatment procedure for analysis of these adducts in biological samples was also developed and applied to human serum. The method showed good precision [good instrumental repeatability (<3% CV), good overall procedure repeatability (<5% CV), and good intermediate precision (< 6% CV)]. A linear response was obtained for adrenaline concentrations of 0 to 175 µM. The limit of detection was greatly improved by the extraction process (2 pmol and 0.066 pmol for the 1st and 2nd mono GSH conjugates, respectively) falling into the expected catecholamine levels occurring in certain pathophysiological conditions. The extraction recoveries were different for both adrenaline-GSH monoconjugates (between 51 and 93%, depending on the adduct and on the tested adrenaline concentration). In conclusion, the development of this method allows the direct analysis of GSH adducts of adrenaline in human serum, providing a valuable tool for the study of the catecholamines oxidation process and the toxicity associated with these compounds.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	3
1.1. As Catecolaminas	3
1.1.1 As Catecolaminas no Sistema Nervoso Autónomo.....	6
1.1.1.1. Organização do Sistema Nervoso Autónomo	7
1.1.1.2. Neurotransmissores e Receptores do Sistema Nervoso Autónomo.....	9
1.1.1.3. Funções do Sistema Nervoso Autónomo.....	10
1.1.2 Neuroquímica das Catecolaminas.....	12
1.1.2.1. Biossíntese das Catecolaminas	12
1.1.2.2. Armazenamento e Libertação das Catecolaminas	16
1.1.2.3. Modulação da Síntese e Libertação das Catecolaminas....	18
1.1.2.4. Receptores das Catecolaminas.....	20
1.1.2.4.1 Receptores Adrenérgicos	20
1.1.2.4.1.1 Receptores α-Adrenérgicos	21
1.1.2.4.1.2 Receptores β-Adrenérgicos	22
1.1.2.4.2 Receptores Dopaminérgicos	24
1.1.2.5. Inactivação e Catabolismo das Catecolaminas	26
1.1.3 Aminas Simpaticomiméticas	32
1.2. A Toxicidade das Catecolaminas	35
1.2.1 Stress Oxidativo na Toxicidade das Catecolaminas	35
1.2.1.1. Metabolização oxidativa pela MAO	37
1.2.1.2. Oxidação das Catecolaminas a Quinonas e Aminocromos..	38
1.2.1.2.1 Via Oxidativa das Catecolaminas.....	38
1.2.1.2.2 Formação de Aductos com a Glutathione	45
1.2.2 Cardiotoxicidade.....	49
1.2.3 Neurotoxicidade.....	56
1.2.4 Hepatotoxicidade	66
1.2.5 Nefrotoxicidade.....	70
2. OBJECTIVOS DO TRABALHO.....	77

3. MATERIAIS E MÉTODOS	83
3.1. Síntese dos aductos das catecolaminas com a GSH	83
3.2. Separação e detecção dos aductos das catecolaminas com a GSH..	
.....	85
3.2.1 Sistema cromatográfico e coluna.....	85
3.2.2 Fase móvel	87
3.3. Caracterização dos aductos das catecolaminas com a GSH.....	88
3.3.1 Análise por espectrometria de UV/VIS	88
3.3.2 Análise por espectrometria de massa	88
3.3.3 Aducto 5-(glutation-S-il)adrenalina purificado	89
3.4. Processo de extracção pela alumina dos aductos das catecolaminas com a GSH em amostras biológicas	90
3.5. Tratamento de dados.....	93
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
4.1. FASE I - Síntese dos aductos das catecolaminas com a GSH e optimização das condições cromatográficas para a sua detecção	97
4.1.1 Influência da percentagem de metanol na fase móvel na resolução cromatográfica dos aductos	99
4.1.2 Selecção das condições de detecção electroquímica.....	102
4.2. FASE II - Caracterização dos aductos das catecolaminas com a GSH	
.....	107
4.2.1 Análise por espectrometria de UV/VIS	108
4.2.2 Análise por espectrometria de massa	114
4.2.3 Aducto 5-(glutation-S-il)adrenalina purificado	118
4.3. FASE III – Optimização das condições de detecção dos aductos das catecolaminas com a GSH.....	120
4.3.1 Estudos de linearidade.....	120
4.3.2 Estabilidade dos aductos em função do pH.....	128
4.3.2.1. Estabilidade dos aductos em PCA a 5% (pH < 1).....	129
4.3.2.2. pH 12,0	132
4.3.2.3. pH 8,0	135
4.3.2.4. pH 6,0	138

4.3.2.5.	pH 4,0	141
4.3.2.6.	Conclusão	143
4.4.	FASE IV – Desenvolvimento de uma metodologia para a extracção dos aductos das catecolaminas com a GSH.....	144
4.4.1	Optimização do processo de extracção	144
4.4.1.1.	Avaliação de eventuais perdas de aductos durante o processo extractivo.....	147
4.4.1.2.	Concentração de EDTA no tampão Tris/EDTA.....	149
4.4.1.2.1	Estudos com a adrenalina	149
4.4.1.2.2	Estudos com os aductos da adrenalina com a GSH	153
4.4.1.3.	Seleção do tipo e volume de solvente extractor.....	155
4.4.1.4.	Duração da agitação da amostra com a alumina.....	171
4.4.1.5.	Avaliação do efeito da temperatura e Ultra-sons na dessorção dos compostos	173
4.4.2	O aducto 5-(glutation-S-il)- α -metildopamina (5-GSH- α -MeDA) como padrão interno.....	177
4.4.3	Avaliação da formação de aductos na ausência de tirosinase....	184
4.5.	FASE V- Validação da metodologia implementada para a detecção dos aductos da adrenalina com a GSH em soro humano.....	197
4.5.1	Selectividade	199
4.5.2	Precisão	201
4.5.2.1.	Repetibilidade instrumental.....	204
4.5.2.2.	Repetibilidade do Procedimento Experimental Global.....	210
4.5.2.3.	Precisão Intermédia.....	215
4.5.3	Linearidade e Calibração	217
4.5.4	Limite de Detecção	227
4.5.5	Recuperações do Processo de Extracção.....	232
5.	CONCLUSÕES GERAIS	239
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	245

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 -Via biossintética das catecolaminas.....	13
Figura 1.2 - Metabolismo das catecolaminas.	31
Figura 1.3 - Estruturas químicas de amins simpaticomiméticas.....	33
Figura 1.4 - Formação de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e HO^{\cdot} a partir da redução univalente sequencial de quatro electrões do oxigénio molecular.....	35
Figura 1.5 - Formação do radical HO^{\cdot} na presença de Fe^{2+} e Cu^+ Reacção de Fenton.....	36
Figura 1.6 - Formação de H_2O_2 durante a reacção metabólica catalisada pela MAO.....	37
Figura 1.7 - Mecanismo proposto para a oxidação das catecolaminas a aminocromos.....	40
Figura 1.8 - Mecanismos propostos para a reactividade dos aminocromos.....	44
Figura 1.9 - Reacção de substituição e de adição entre aminocromos e tióis.....	46
Figura 1.10 - Mecanismo proposto para a formação de aductos das catecolaminas com a glutathione.....	47
Figura 1.11- Formação de bases de Schiff a partir das catecolaminas-o-quinonas.....	48
Figura 1.12 - Metabolismo oxidativo da MDMA e MDA.....	63
Figura 3.1- Protocolo experimental para a síntese de aductos das catecolaminas com a GSH.....	84
Figura 3.2 - Protocolo experimental adaptado para extracção, pela alumina, de aductos das catecolaminas com a GSH.....	92

Figura 4.1- Influência da percentagem de metanol na fase móvel na separação cromatográfica dos compostos presentes numa mistura reaccional contendo adrenalina (TP + ADR 20 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).	100
Figura 4.2 Influência da percentagem de metanol na fase móvel na separação cromatográfica dos compostos presentes numa mistura reaccional contendo noradrenalina (A) (TP + NA 20 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) ou dopamina (B) (TP + DA 20 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).....	101
Figura 4.3 - Voltamogramas hidrodinâmicos dos monoconjugados da adrenalina com a GSH (amostra injectada no sistema de HPLC-ED: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).	106
Figura 4.4 - Cromatograma obtido, por detecção de fotodíodos, após injeção de 20 μ L de uma mistura de reacção com adrenalina 0,1 mM (TP + ADR 0,1 mM + GSH 0,5 mM + TIR).....	109
Figura 4.5 - Espectros de absorvância obtidos para os três picos detectados após injeção de uma mistura reaccional com uma concentração de 0,1 mM de adrenalina (TP + ADR 0,1 mM + GSH 0,5 mM + TIR).....	109
Figura 4.6 - Cromatograma obtido, por detecção UV/Vis, após injeção de 20 μ L de uma mistura de reacção com noradrenalina 0,5 mM (TP + NA 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR).	111
Figura 4.7 - Espectros de absorvância obtidos para os três picos detectados após injeção de uma mistura reaccional com noradrenalina 0,5 mM (TP + NA 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR).	112
Figura 4.8 - Cromatogramas, obtidos por detecção UV/Vis após injeção de 20 μ L de uma mistura de reacção com dopamina 0,5 mM (TP + DA 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR).	112
Figura 4.9 - Espectros de absorvância obtidos para os três picos detectados após injeção de uma mistura reaccional com dopamina 0,5 mM (TP + DA 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR).....	113

Figura 4.10 - Espectro ESI/MS obtido por varrimento no momento de saída do pico do 2º monoconjugado. Amostra injectada: TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR.	116
Figura 4.11 - Espectros ESI/MS/MS correspondentes ao fraccionamento do ião molecular detectado para cada composto (amostra injectada: TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR).	117
Figura 4.12 – Cromatogramas resultantes da injeção de 20 µL de 5-(glutation-S-il)-adrenalina purificado (rosa) e de uma amostra de tampão que contém aductos da adrenalina com a GSH (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) (azul).	119
Figura 4.13 - Cromatograma obtido após injeção de 20 µL de uma mistura de reacção contendo os aductos da ADR com a GSH (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).	121
Figura 4.14 - Curvas de calibração do valor da área de cada pico em função da concentração de adrenalina na mistura de reacção (TP + ADR 0,08 a 8 µM + GSH 0,5 mM + TIR).	122
Figura 4.15 - Cromatograma obtido após injeção de 20 µL de uma mistura de reacção efectuada em tampão contendo noradrenalina (TP + NA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).	123
Figura 4.16 - Curvas de calibração do valor da área de cada pico em função da concentração de noradrenalina na mistura de reacção (TP + NA 0,08 a 10 µM + GSH 0,5 mM + TIR).	125
Figura 4.17 - Cromatograma obtido após injeção de 20 µL de uma mistura de reacção efectuada em tampão com a dopamina (TP + DA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).	126
Figura 4.18 - Curvas de calibração do valor da área de cada pico em função da concentração de dopamina na mistura de reacção (TP + DA 0,16 a 100 µM + GSH 0,5 mM + TIR). A – 1º monoconjugado; B – 2º monoconjugado.	127

Figura 4.19 - Cromatogramas resultantes da injeção de 20 µL de uma mistura de reacção (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) a pH 12,0.	133
Figura 4.20 - Espectro de absorvância do composto formado como consequência da alteração do valor de pH (tempo de retenção: 3,4 minutos).	134
Figura 4.21 - Estrutura química dos aductos da adrenalina com a GSH na forma quinónica.	134
Figura 4.22 - Cromatogramas resultantes da injeção de 20µL de uma mistura de reacção (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) a pH 8,0.	136
Figura 4.23 - Cromatogramas resultantes da injeção de 20µL de uma mistura de reacção (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) a pH 6,0.	139
Figura 4.24 – Cromatogramas resultantes da injeção de 20µL de uma mistura de reacção (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) a pH 4,0.	142
Figura 4.25 – Análise de eventuais perdas dos compostos durante o processo de extracção de uma amostra (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) pela alumina.	148
Figura 4.26 - Eficácia de extracção de uma amostra de adrenalina (5 µM) em PCA a 5%.	150
Figura 4.27 - Eficácia da extracção de uma amostra de adrenalina (0,1 µM) em PCA a 5% (a baixa resolução dos picos deve-se ao facto de se utilizarem concentrações muito reduzidas de adrenalina).	152
Figura 4.28 - Influência da concentração de EDTA presente no tampão de neutralização na eficácia do processo de extracção dos aductos da ADR com a GSH (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) pela alumina.	154
Figura 4.29 - Capacidade extractora do PCA em função da sua concentração (5%, 10% e 15%). Amostra extraída: TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR.	157

Figura 4.30 - Capacidade extractora do PCA em função da sua concentração (5%, 10% e 15%) – segunda adição de 150 µL PCA pelo filtro com a alumina utilizada na extracção de uma amostra (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).	159
Figura 4.31 - Efeito do fraccionamento do volume de PCA a 5% (300 µL) utilizado na extracção de uma amostra (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) em mais do que uma adição (300 µL, 2*150 µL e 3*100 µL) na eficácia do processo extractivo.	160
Figura 4.32 - Efeito do fraccionamento do volume de PCA a 5% (300 µL) utilizado na extracção de uma amostra (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) em mais do que uma adição (300 µL, 2*150 µL e 3*100 µL) na eficácia do processo extractivo após segunda adição de 150 µL PCA pelo filtro com a alumina utilizada na extracção de uma amostra.	162
Figura 4.33 - Capacidade extractora do ácido acético em função da sua concentração (50, 70 e 100%). Amostra extraída: TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR.	163
Figura 4.34 – Efeito do tipo e volume de solvente extractor na eficácia do processo extractivo. Amostra extraída: TP + NA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR. ...	165
Figura 4.35 - Efeito do tipo e volume de solvente extractor na eficácia do processo extractivo. Amostra extraída: TP + NA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR.....	167
Figura 4.36 - Efeito do tipo e volume de solvente extractor na eficácia do processo extractivo – segunda adição de PCA a 5% pelo filtro com a alumina utilizada na extracção de uma amostra (TP + NA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).	169
Figura 4.37 - Efeito do tipo e volume de solvente extractor na eficácia do processo extractivo dos aductos da dopamina e GSH (TP + DA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).	170
Figura 4.38 - Influência do tempo de agitação (30 s; 5, 10, 15, 25 e 35 min) da amostra (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) com a alumina na eficácia do processo de extracção.	171

Figura 4.39 - Efeito da temperatura no processo de dessorção dos aductos da NA com a GSH (TP + NA 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).	174
Figura 4.40 - Efeito do contacto com sonda de ultra-sons e da imersão em banho de ultra-sons no processo de dessorção dos aductos da ADR com a GSH (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).	175
Figura 4.41 - Estrutura do aducto 5-(glutathion-S-il)- α -MeDA (5-GSH- α -MeDA ; PM=553,42 g/mol).....	178
Figura 4.42 - Curva de calibração do monoconjugado da metildopamina com a GSH (5-GSH- α -MeDA 0,16 a 100 μ M em PCA a 5%).	179
Figura 4.43 - Cromatogramas obtidos após injeção de amostras extraídas e não extraídas de 5-GSH- α -MeDA 2 μ M.	181
Figura 4.44 - Cromatogramas obtidos pela injeção de 20 μ L de solvente extractor usado na 1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª adições à alumina usada durante o processo de extracção de uma amostra de 4 μ M de 5-GSH- α -MeDA	182
Figura 4.45 - Cromatogramas obtidos pela injeção de 20 μ L de PCA a 5% usado na 1ª adição e 20 μ L de Metanol 30% usado na 2ª adição pela alumina usada durante o processo de extracção de uma amostra de 2 μ M de 5-GSH- α -MeDA	183
Figura 4.46 – Cromatogramas obtido, por detecção electroquímica, durante o estudo de avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, após preparação de uma mistura de adrenalina e GSH em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,4 (ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM).....	185
Figura 4.47 - Cromatogramas obtido, por detecção electroquímica, durante o estudo de avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, após preparação de uma mistura de adrenalina e GSH em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,4 (ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM).....	187

Figura 4.48 - Avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, após preparação de uma mistura de adrenalina e GSH em PCA a 5% (ADR 1 mM + GSH 2 mM).	189
Figura 4.49 - Avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, após preparação de uma mistura de adrenalina e GSH em PCA a 5% (ADR 1 mM + GSH 2 mM).	190
Figura 4.50 - Avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, durante a etapa de agitação da amostra (ADR 1 mM + GSH 2 mM) com a alumina e o tampão Tris/EDTA na presença e na ausência de ácido ascórbico 1 mM. ...	191
Figura 4.51 – Avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, durante a etapa de agitação da amostra (ADR 1 mM + GSH 2 mM) com a alumina e o tampão Tris/EDTA na presença e na ausência de ácido ascórbico 5 mM ...	192
Figura 4.52 - Avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, durante a etapa de agitação da amostra (ADR 1 mM + GSH 2 mM) com a alumina e o tampão Tris/EDTA na ausência (A) e na presença (B) de ácido ascórbico 5 mM, ao longo do tempo e em função da temperatura de conservação.....	194
Figura 4.53 – Avaliação da selectividade da metodologia de HPLC-ED para detecção de aductos das catecolaminas com a GSH numa amostra de soro humano (Amostra Branco - Soro + GSH 0,5 mM + TIR e Amostra ADR 4 µM – Soro + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).	201
Figura 4.54 – Avaliação da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em tampão (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) e não sujeita ao processo de extracção pela alumina.....	205
Figura 4.55 - Cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em tampão (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) e sujeita ao processo de extracção pela alumina.	206

Figura 4.56 – Avaliação da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em soro humano (Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e não sujeita ao processo de extracção pela alumina.....	207
Figura 4.57 – Avaliação da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em soro humano (Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e sujeita ao processo de extracção pela alumina.....	208
Figura 4.58 – Avaliação da repetibilidade do procedimento experimental global na presença de misturas reaccionais efectuadas em tampão fosfato (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) não sujeitas (A) e sujeitas (B) ao processo de extracção pela alumina.....	211
Figura 4.59 - Avaliação da repetibilidade do procedimento experimental global na presença de misturas reaccionais efectuadas em soro humano (Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) não sujeitas (A) e sujeitas (B) e ao processo de extracção pela alumina.....	213
Figura 4.60 - Curvas de calibração do valor médio da área de cada pico em função da concentração de adrenalina na mistura de reacção (TP + ADR 0 a 175 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) não sujeita ao processo de extracção.	219
Figura 4.61 - Curvas de calibração do valor médio da área de cada pico em função da concentração de adrenalina na mistura de reacção (TP + ADR 0 a 175 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) sujeita ao processo de extracção.	221
Figura 4.62 - Curvas de calibração do valor médio da área de cada pico em função da concentração de adrenalina na mistura de reacção (Soro + ADR 0 a 175 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).	223
Figura 4.63 - Curvas de calibração do valor médio da área de cada pico em função da concentração de adrenalina na mistura de reacção (Soro + ADR 0 a 4 μ M + GSH 0,5mM + TIR) sujeita ao processo de extracção.	226

Figura 4.64 - Limite de detecção dos monoconjugados da adrenalina com a GSH em misturas reacionais submetidas ao processo de extracção pela alumina. A – 1º monoconjugado. B – 2º monoconjugado.	229
Figura 5.1 - Protocolo experimental proposto para o processamento das amostras de soro humano.	242

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1 - Áreas dos picos correspondentes aos dois compostos detectados (monoconjugados da adrenalina com a GSH) para cada valor de E_2 testado (amostra injectada no sistema de HPLC-ED: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR). 105

Tabela 4.2 - Área dos picos dos monoconjugados obtidos mediante a injeção de misturas de reacção com diferentes concentrações de adrenalina (TP + ADR 0,8 a 8 μ M + GSH 0,5 mM + TIR). 121

Tabela 4.3- Área dos picos dos monoconjugados obtidos mediante a injeção de misturas de reacção com diferentes concentrações de noradrenalina (TP + NA 0,08 a 10 μ M + GSH 0,5 mM + TIR). 124

Tabela 4.4 - Área dos dois principais picos obtido mediante a injeção de misturas de reacção com diferentes concentrações de dopamina (TP + DA 0,16 a 100 μ M + GSH 0,5 mM + TIR). 126

Tabela 4.5 - Áreas do pico do 1º e 2º monoconjugados, obtidas durante o estudo de estabilidade em PCA a 5% à temperatura ambiente e ao longo de 8 dias de estudo (amostra: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR). 130

Tabela 4.6 - Razão entre as áreas dos picos do 1º e 2º monoconjugados, obtidas durante o estudo de estabilidade em PCA a 5% à temperatura ambiente e ao longo de 8 dias de estudo (amostra: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR). ... 131

Tabela 4.7 - Área dos picos correspondentes aos monoconjugados obtidos mediante a injeção de uma amostra (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) com o pH final de 8,0, em função do tempo. 137

Tabela 4.8 - Área dos dois principais picos obtidos mediante a injeção de uma amostra (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) com o pH alterado para um valor de 6,0, em dois dias consecutivos. 140

Tabela 4.9 - Área dos dois principais picos obtidos mediante a injeção de uma amostra (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) com o pH alterado para um valor 4,0, em dois dias consecutivos.	143
Tabela 4.10 - Áreas dos picos obtidos durante o estudo da eficácia de extração de uma amostra de adrenalina (5 µM) em PCA a 5%.	151
Tabela 4.11 - Áreas dos picos obtidos durante o estudo da eficácia de extração de uma amostra de 0,1 µM de adrenalina em PCA a 5%.	153
Tabela 4.12 - Áreas dos picos obtidos durante o estudo da influência da concentração de EDTA (no tampão de extração) na eficácia do processo de extração dos aductos da ADR com a GSH (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).	155
Tabela 4.13 - Áreas dos picos obtidos durante o estudo da capacidade extractora do PCA em função da sua concentração (5%, 10% e 15%). Amostra extraída: TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR.	157
Tabela 4.14 - Áreas dos picos obtidos durante o estudo da possibilidade de fraccionamento do volume de PCA a 5% (300 µL) utilizado na extração de uma mistura reaccional (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) em mais do que uma adição (300 µL, 2*150 µL e 3*100 µL).....	161
Tabela 4.15 - Áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da capacidade extractora do ácido acético (50, 70 e 100%).	163
Tabela 4.16 - Áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos, por detecção electroquímica, durante o estudo da selecção do tipo e volume de solvente extractor. Amostra extraída: TP + NA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR.....	165
Tabela 4.17 - Áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos, por detecção electroquímica, durante o estudo da selecção do tipo e volume de solvente extractor para os aductos da noradrenalina e a GSH. Amostra extraída: TP + NA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR.	167

Tabela 4.18 - Áreas dos picos obtidos durante o estudo da influência do tempo de agitação da amostra (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) com a alumina na eficácia do processo de extracção pela alumina.	172
Tabela 4.19 - Áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo do efeito do contacto com sonda de ultra-sons e da imersão em banho de ultra-sons no processo de dessorção. Amostras extraídas: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR.	176
Tabela 4.20 - Valores de área do pico correspondente ao composto 5-GSH- α -MeDA (2 μ M) em função da condição experimental a que foi submetida a amostra.	180
Tabela 4.21 - Coeficiente de variação (CV) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de fracções mássicas do elemento.	203
Tabela 4.22 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em tampão (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e não sujeita ao processo de extracção pela alumina.	205
Tabela 4.23 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em tampão (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e sujeita ao processo de extracção pela alumina.	206
Tabela 4.24 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em soro humano (Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e não sujeita ao processo de extracção pela alumina.	208

Tabela 4.25 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em soro humano (Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e sujeita ao processo de extracção pela alumina..... 209

Tabela 4.26 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade do procedimento experimental global na presença de misturas reacionais efectuadas em tampão fosfato (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR), não sujeitas e sujeitas ao processo de extracção pela alumina..... 212

Tabela 4.27 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade do procedimento experimental global na presença de misturas reacionais efectuadas em soro humano (Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR), não sujeitas e sujeitas ao processo de extracção pela alumina..... 214

Tabela 4.28 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da precisão intermédia na presença de misturas reacionais efectuadas em tampão fosfato (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR), mantidas à temperatura ambiente e injectadas ao longo de cinco dias consecutivos. 216

Tabela 4.29 - Área média dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da linearidade da resposta do detector face à presença de misturas reacionais efectuadas em tampão fosfato com diferentes concentrações de adrenalina (TP + ADR 0 a 175 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) não sujeitas ao processo de extracção pela alumina. 219

Tabela 4.30 - Área média dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da linearidade da resposta do detector face à presença de misturas reacionais efectuadas em tampão fosfato com diferentes concentrações

de adrenalina (TP + ADR 0 a 175 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) sujeitas ao processo de extracção pela alumina. 220

Tabela 4.31 - Área média dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da linearidade da resposta do detector face à presença de misturas reaccionais efectuadas em soro humano com diferentes concentrações de adrenalina (Soro + ADR 0 a 175 μ M + GSH 0,5 mM + TIR), sujeitas e não sujeitas ao processo de extracção pela alumina. 222

Tabela 4.32 - Área média dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da linearidade da resposta do detector face à presença de misturas reaccionais efectuadas em soro humano com diferentes concentrações de adrenalina (Soro + ADR 0 a 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR), sujeitas ao processo de extracção pela alumina. 225

Tabela 4.33 - Limites de detecção dos monoconjugados presentes em misturas reaccionais efectuadas em soro humano sujeitas e não sujeitas ao processo de extracção pela alumina, expressos em quantidade de adrenalina presente na mistura reaccional. 228

Tabela 4.34 - Valores de área do pico correspondente ao 1º e 2º monoconjugado obtidos durante o estudo de validação do limite de detecção (Soro + ADR 0,1 μ M + GSH 0,5 mM + TIR e Soro + ADR 3,3 nM + GSH 0,5 mM + TIR). 230

Tabela 4.35 - Valores médios de área dos picos obtidos durante o estudo de avaliação da recuperação do processo de extracção. Amostras extraídas: Soro + ADR 200 μ M + GSH 0,5 mM + TIR; Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR e Soro + ADR 0,8 μ M + GSH 0,5 mM + TIR. 234

Tabela 4.36 - Valores médios de eficácia de extracção dos dois monoconjugados da adrenalina com a GSH estabelecidos para diferentes valores de concentração de adrenalina na mistura reaccional (Soro + ADR X μ M + GSH 0,5 mM + TIR, em que X pode ser 200, 4 ou 0,8 μ M). 234

ABREVIATURAS

Ach - Acetilcolina

ADP - Adenosina 5'-difosfato

ADR - Adrenalina

AMPc - Nucleótido cíclico adenosina 5'-monofosfato

AMPT - α -metil-*p*-tirosina

ATP - Adenosina 5'-trifosfato

BHE - Barreira hemato-encefálica

CaMKs - proteínas cinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina

cDNA - DNA complementar

CID - Coagulação intravascular disseminada

COMT - Catecol-O-metiltransferase

CSF – Fluido cerebroespinal

CTPs - Células tubulares proximais renais

CV - Coeficiente de variação

DA - Dopamina

DBH - Dopamina β -hidroxilase

DDC - DOPA descarboxilase

DHMI - 5,6-diidroxi-1-metilindolo

DHMIIs - 5,6-diidroxi-1-metilisatina

DHTB-1 - Ácido 7-(2-aminoetil)-3,4-diidro-5-hidroxi-2H-1,4-benzotiazina-3-carboxílico

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DOMA - Ácido 3,4-diidroxi-mandélico

DOPAC - Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

DOPEG - 3,4-diidroxifeniletileneglicol

DOPGAL - 3,4-diidroxifenilglicolaldeído

E₁- Eléctrodo de *screening*

E₂ - Eléctrodo analítico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético (*ethylenediammine tetracetic acid*)

ESI/MS - Espectros de *electrospray*

ESI/MS/MS - Espectros de massa em série

FAD - Dinucleótido de adenina flavina

FADH₂ – Forma reduzida do dinucleótido de adenina flavina

FDA - *Food and Drug Administration*

γ-GT - γ-glutamiltanspeptidase

GPX - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione redutase

GSH - Glutathione reduzida

5-GSH-α-MeDA - 5-(glutathione-S-yl)- α-metildopamina

GSSG - Glutathione oxidada

GST - Glutathione S-transferase

GTP - Guanosina 5'-trifosfato

H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

HO• - Radical hidroxilo

HPLC - Cromatografia líquida de alta resolução (*High Performance Liquid Chromatography*)

HPLC-DAD - Cromatografia líquida de alta resolução com detecção por fotodíodos (*High Performance Liquid Chromatography with diode array detection*)

HPLC-ED - Cromatografia líquida de alta resolução com detecção electroquímica (*High Performance Liquid Chromatography with electrochemical detection*)

HPLC-MS - Cromatografia líquida de alta resolução com espectrometria de massa (*High Performance Liquid Chromatography with mass spectrometry detection*)

5-HT - 5-Hidroxitriptamina (serotonina)

HVA - Ácido homovanílico

ICR - Índice de controlo respiratório

ISO - Isoprenalina

K_m - Contante de Michaelis-Menten

L- DOPA - 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina

MAO - Monoamino oxidase

MDA - 3,4-metilenodioxianfetamina

MDMA - 3,4-metilenodioximetanfetamina

α -MeDA - α -metildopamina

MOPEG - 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenoglicol

MOPGAL - 3-metoxi-4-hidroxifenilglicoaldeído

NA - Noradrenalina

NADH - Nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida

N-Me- α -MeDA - *N*-metil- α -metildopamina

NO - Monóxido de azoto

O₂^{•-} - Radical superóxido

ODS - Octadecilsilano

PCA - Ácido perclórico

PI-PLC – Fosfolipase C específica para o fosfoinositol (*Phosphoinositide-specific phospholipase C*)

PKA - Proteína cinase dependente de AMPc

PKC - Proteína cinase dependente de cálcio

PNMT - Feniletanolamina N-metiltransferase (*Phenylethanolamine N-methyltransferase*)

R² - Coeficiente de regressão linear

RMN - Ressonância magnética nuclear

RNS - Espécies reativas de azoto

ROS - Espécies reativas de oxigénio (*reactive oxygen species*)

RSD - Desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)

S - Soro Humano

SD - Desvio padrão (*standard deviation*)

SNC - Sistema nervoso central

SOD - Superóxido-dismutase

TA - Temperatura Ambiente

TH - Tirosina hidroxilase

TIR - Tirosinase

TOF - Tempo de voo (*time of fly*)

TP - Tampão fosfato

Tris - Tampão Trizma base

UV - Ultravioleta

UV/VIS - Ultravioleta/visível

VMA - Ácido vanililmandélico

V_{max} - Velocidade máxima

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. As Catecolaminas

O primeiro estudo relacionado com as catecolaminas endógenas remonta a 1895, quando Oliver e Schäfer demonstraram o efeito pressor de extractos adrenais (1). Em 1899, Abel identificou e apelidou o princípio activo de adrenalina (ADR), e Stolz e Dakin procederam à sua síntese [ver em (2)].

A primeira sugestão concreta da existência de um mecanismo neuro-humoral surgiu no início do século vinte. A semelhança entre os efeitos resultantes da injeção de extractos da medula adrenal e a estimulação dos nervos simpáticos foi constatada por Lewandowsky em 1898 (3) e Langley em 1901 (4). Alguns anos mais tarde (1905), T. R. Elliott, estudante de Langley em Cambridge, revelou que os impulsos dos nervos simpáticos libertam quantidades instantâneas de uma substância, tipo adrenalina, em contacto imediato com células efectoras [ver em (5)]. Considerou, deste modo, a ADR como intermediário químico no processo de transmissão simpática. Constatou ainda que, algum tempo após a degeneração dos nervos simpáticos, os órgãos efectores continuam a responder caracteristicamente à hormona da medula adrenal [ver em (5)]. Ainda no mesmo ano, Langley sugeriu que as células efectoras acima referidas possuem “substâncias receptivas” excitatórias e inibitórias e que a resposta à ADR depende do tipo de substância presente [ver em (5)]. Sensivelmente no mesmo período (1907), Dixon referiu a existência de correspondência entre os efeitos do alcalóide muscarina e as respostas à estimulação vagal, avançando com a noção de que o nervo vago libertaria uma substância tipo muscarina que actuaria como transmissor químico destes impulsos. Ainda no mesmo ano, Reid Hunt descreveu as acções da acetilcolina (Ach) e outros ésteres da colina [ver em (5)]. Em 1910, Barger e Dale estudaram a actividade farmacológica de um elevado número de aminas sintéticas relacionadas com a ADR e designaram a sua acção como simpaticomimética (6). Este estudo determinou, igualmente, os requisitos estruturais básicos para a actividade. Um pouco mais tarde, em 1914, Dale distinguiu as acções do tipo

nicotínico e do tipo muscarínico através do estudo das propriedades farmacológicas da Ach e de outros ésteres da colina. A notável fidelidade com a qual a Ach reproduzia as respostas à estimulação dos nervos parassimpáticos levou Dale a introduzir o termo de parassimpaticomimético para designar estes efeitos. Constatou, também, que este composto apresentava uma acção de curta duração propondo, deste modo, a rápida degradação da Ach em ácido acético e colina, mediada por uma esterase presente nos tecidos [ver em (5)].

Em 1921, Cannon e Uridil constataram que a estimulação dos nervos hepáticos simpáticos resultaria na libertação de uma substância idêntica à ADR, a qual induzia o aumento da pressão sanguínea e do ritmo cardíaco (7). Estudos posteriores demonstraram que esta substância, designada por Cannon como “sympathin”, se tratava de um mediador químico libertado pelos nervos simpáticos ao nível das junções neuroefectoras. Esta substância “sympathin” assemelhava-se, em muitas propriedades farmacológicas e químicas, à ADR embora diferisse, tal como constatado em 1910 por Barger e Dale, no facto dos efeitos da estimulação nervosa simpática serem mais fielmente reproduzidos pela injeção de aminas primárias simpaticomiméticas, do que pela ADR ou outras aminas secundárias [ver em (5)]. Tal facto levou a que se avançasse com a possibilidade da noradrenalina (adrenalina desmetilada) ser uma “sympathin”, hipótese que se confirmou em 1946 por Von Euler com extractos altamente purificados de nervo esplénico de bovinos. Este autor considerou, então, a noradrenalina (NA) como a substância simpaticomimética predominante nos nervos simpáticos pós-ganglionares de mamíferos, actuando como mediador adrenérgico libertado em consequência da sua estimulação [ver em (5)].

As catecolaminas libertadas pelo sistema nervoso simpático e medula adrenal estão envolvidas na regulação de um grande número de funções fisiológicas, especialmente no que respeita a respostas integradas a um conjunto de situações de stress, que de outro modo comprometeriam os mecanismos homeostáticos. São compostos simpaticomiméticos constituídos por um grupo catecol (dihidroxibenzeno em posição *orto*) e um grupo amina. A NA é o principal neurotransmissor no sistema nervoso simpático periférico, enquanto que a ADR é a principal hormona secretada pela medula adrenal nos mamíferos e está

associada a estados de excitação, alerta, nervosismo, medo ou mesmo pânico. Estas moléculas têm, por conseguinte, uma acção fundamental, ao nível fisiológico, na condução e efectivação de estímulos neurológicos e neuromotores (como por exemplo, actividade física, stress psicológico ou choque hipovolémico). As respostas fisiológicas e metabólicas que se seguem a uma estimulação dos nervos simpáticos em mamíferos são geralmente mediadas pelo neurotransmissor NA, apesar de co-transmissores, como péptidos, poderem potencialmente contribuir para os efeitos simpáticos. Como parte da resposta ao stress, a medula adrenal é também estimulada, resultando no aumento da concentração de ADR na circulação sanguínea. As acções destas duas catecolaminas são muito semelhantes em alguns locais, mas diferem significativamente noutros. Por exemplo, ambos os compostos estimulam o miocárdio; contudo, a ADR dilata os vasos sanguíneos no músculo-esquelético, enquanto que a NA causa a constrição dos vasos sanguíneos na pele, mucosas e rins.

A ADR e a NA são, no entanto, apenas duas das três catecolaminas endógenas, sendo a outra a dopamina (DA). A DA é o precursor da NA e, apesar de ser encontrada predominantemente nos gânglios basais do SNC, onde funciona como neurotransmissor em diversas vias importantes, as terminações nervosas dopaminérgicas e os receptores específicos para esta catecolamina foram também encontrados noutros locais do SNC e na periferia (particularmente no rim). Esta catecolamina endógena, inicialmente considerada apenas precursora da NA, veio a revelar-se fundamental como neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC).

Pela sua importância, várias catecolaminas sintéticas foram produzidas para serem usadas como fármacos. São exemplo deste tipo de fármacos a isoprenalina (isoproterenol, ISO), a dobutamina e a terbutalina. Deste modo, as aminas simpaticomiméticas (catecolaminas que ocorrem naturalmente e fármacos que mimetizam as suas acções) e os antagonistas dos receptores adrenérgicos (substâncias que bloqueiam os efeitos da estimulação simpática) constituem dois dos grupos de agentes farmacológicos mais extensivamente utilizados. Muitas das acções dos agonistas e antagonistas dos receptores adrenérgicos são

compreensíveis em termos dos efeitos fisiológicos conhecidos das catecolaminas. As catecolaminas endógenas, como por exemplo a ADR, são por vezes usadas como fármacos, constituindo os análogos estruturais da ADR e da NA a maioria dos agonistas adrenérgicos disponíveis como agentes farmacológicos. Estes compostos sintéticos têm inúmeras vantagens como agentes terapêuticos (como a sua adequada biodisponibilidade oral, prolongada duração de acção, e especificidade para subtipos de receptores adrenérgicos), as quais contribuem para aumentar as suas acções terapêuticas e para diminuir potenciais efeitos adversos [ver em (5)].

1.1.1 As Catecolaminas no Sistema Nervoso Autónomo

O sistema nervoso motor divide-se em somático e autónomo (5, 8). Esta divisão explica-se, quer por questões fisiológicas como, também, anatómicas. Realçando os aspectos fundamentais desta diferença, é possível referir (9):

- O sistema nervoso somático consiste em neurónios sensoriais (que transmitem informação de receptores localizados primariamente na cabeça, tronco e extremidades) e em neurónios motores responsáveis pelo movimento voluntário e consciente; o sistema nervoso autónomo regula as actividades viscerais, fazendo-o de forma automática e inconsciente.
- As conexões neuronais do sistema nervoso somático estão inteiramente localizadas dentro do SNC enquanto que, virtualmente, todos os nervos autónomos têm gânglios localizados fora do SNC.
- A maioria dos nervos somáticos que controlam a função motora é mielinizada e transmite rapidamente os impulsos, enquanto que a maioria dos nervos autónomos pós-ganglionares não é mielinizada, conduzindo os impulsos a velocidades relativamente lentas. A maioria dos neurónios pré-ganglionares é, também, mielinizada conduzindo os impulsos rapidamente.

- No sistema nervoso somático todas as vias motoras envolvem apenas um neurónio eferente do SNC, que sinapsa directamente no músculo-esquelético e secreta apenas Ach. Por sua vez, no sistema nervoso autónomo existem dois neurónios eferentes, em cuja mediação química estão envolvidas, além da Ach, as catecolaminas NA e ADR.

Deste modo, dado o facto de a ADR e a NA, desempenharem um papel fundamental como neurotransmissores do sistema nervoso autónomo, mais em particular do sistema nervoso autónomo simpático, para melhor compreender a importância destas catecolaminas no contexto desta dissertação, este sistema será abordado de um modo mais pormenorizado.

1.1.1.1. Organização do Sistema Nervoso Autónomo

O sistema nervoso autónomo controla processos viscerais chave, incluindo o *output* cardíaco, fluxo sanguíneo para órgãos específicos, secreções glandulares, eliminação de compostos, função sexual, e outros processos indispensáveis à vida (9). Constitui, deste modo, um sistema nervoso eferente periférico (representado na periferia por nervos, gânglios e plexos) que fornece enervação para o coração, vasos sanguíneos, órgãos viscerais, glândulas e músculo liso de vários tecidos (5, 9). Muitas das acções autónomas efectuam-se fora do sistema nervoso central, quer nas junções ao longo das fibras nervosas que enervam órgãos específicos, quer ao nível da junção do nervo com o órgão. Este sistema encontra-se, consequentemente, amplamente distribuído no organismo e regula as funções destes órgãos de uma forma que está, geralmente, e tal como referido anteriormente, para além do controlo consciente sendo, por isso, muitas vezes designado de sistema nervoso involuntário (5, 9).

Os nervos autónomos são constituídos por dois sistemas de neurónios, designados de pré-ganglionares e pós-ganglionares, com base na localização anatómica relativamente aos gânglios, ou centros de transmissão. Um neurónio pré-ganglionar tem o seu corpo celular na medula espinal ou cérebro e é modulado por centros superiores no cérebro ou por reflexos espinais. O axónio do

neurónio pré-ganglionar deixa a medula espinal nas regiões craniana, torácica, lombar ou sacral, e forma uma conexão sináptica nos gânglios autónomos com o corpo celular da fibra nervosa autónoma pós-ganglionar. Os neurónios pós-ganglionares enviam os seus axónios directamente para os órgãos efectores completando, então, a via de enervação autónoma dos órgãos viscerais involuntários periféricos. A função dos nervos autónomos periféricos é, deste modo, a modulação da contínua actividade dos órgãos viscerais involuntários, induzindo respostas excitatórias ou inibitórias (5).

No que respeita aos nervos eferentes, o sistema nervoso autónomo periférico consiste em duas amplas divisões: o efluxo parassimpático ou craniossacral e o efluxo simpático ou toracicolombar, que será aqui abordado em maior pormenor. Existem muitas diferenças anatómicas e funcionais que distinguem estes dois sistemas, mas ambos consistem em fibras pré-ganglionares que comunicam com as fibras pós-ganglionares ao nível dos gânglios. As fibras pré-ganglionares têm origem na espinal-medula, variando a posição dependendo do sistema (5, 9).

Os corpos celulares dos neurónios pré-ganglionares simpáticos encontram-se na coluna celular intermediolateral da medula espinal (*intermediolateral cell column of the spinal cord*), ao nível torácico e lombar (9). Estes neurónios pré-ganglionares simpáticos, relativamente curtos, deixam a medula espinal na zona torácica e lombar, designada por efluxo toracicolombar, e os seus curtos axónios enviam projecções para os gânglios basais localizados fora das vértebras espinais. Os 22 gânglios segmentalmente organizados consistem em duas cadeias localizadas bilateralmente em relação à medula espinal. Os neurónios pós-ganglionares apresentam os corpos celulares na cadeia simpática paravertebral ganglionar, enviando as longas fibras pós-ganglionares para os órgãos efectores correspondentes. A maioria dos neurónios simpáticos pré-ganglionares apresenta a sinapse nos gânglios simpáticos paravertebrais, apesar de algumas fibras pré-ganglionares passarem estes gânglios vertebrais sem efectuar conexões sinápticas, viajando para os gânglios pré-vertebrais localizados numa posição frontal à coluna vertebral (gânglio celíaco, mesentérico superior e

inferior). Os gânglios terminais terminam perto dos órgãos que enervam, designadamente a bexiga e o recto (9).

A medula adrenérgica, situada na região supra-renal, é uma combinação de gânglio e glândula. É enervada por fibras pré-ganglionares simpáticas típicas (cujo neurotransmissor é a Ach) e liberta catecolaminas (ADR e NA) para a circulação sanguínea (5, 9). Contudo, ao contrário dos terminais nervosos simpáticos pós-ganglionares que libertam NA como neurotransmissor, a medula adrenérgica liberta ADR como principal catecolamina.

A divisão parassimpática do sistema nervoso autónomo difere grandemente da divisão simpática. Os neurónios pré-ganglionares são extremamente longos, estando os gânglios parassimpáticos localizados muito próximo ou mesmo nos órgãos efectores e, deste modo, os neurónios pós-ganglionares parassimpáticos são muitos curtos. Os corpos celulares das fibras pré-ganglionares têm origem no cérebro e medula espinal, deixando estes locais na região craniana e sacral, dando origem ao termo efluxo craniosacral. A secção craniana do sistema parassimpático enerva estruturas na cabeça, pescoço, tórax e abdómen. Estas fibras viajam nos nervos cranianos oculomotor, facial, glossofaríngeo e vagal. A divisão sacral do sistema nervoso parassimpático constitui o nervo pélvico e enerva as restantes regiões dos intestinos e das vísceras pélvicas, incluindo a bexiga e os órgãos reprodutores (9).

1.1.1.2. Neurotransmissores e Receptores do Sistema Nervoso Autónomo

O neurotransmissor de todas as fibras autónomas pré-ganglionares, quer simpáticas quer parassimpáticas, é a Ach sendo, consequentemente, designadas por fibras colinérgicas. Ao nível das fibras pós-ganglionares, que conduzem os estímulos desde os gânglios até aos órgãos efectores, verificam-se diferenças entre os dois sistemas no que respeita ao neurotransmissor presente. Deste modo, em todas as fibras parassimpáticas pós-ganglionares, e em algumas fibras simpáticas pós-ganglionares (fibras que enervam as glândulas sudoríparas), o

neurotransmissor presente é, também, a Ach e, por esta razão, são igualmente designadas de fibras colinérgicas. Por outro lado, as fibras adrenérgicas constituem a maioria das fibras simpáticas pós-ganglionares e apresentam como neurotransmissor a noradrenalina. De salientar que os diversos órgãos efectores podem sofrer influências de ambos os sistemas (5, 9).

Os dois sistemas diferem, igualmente, no que respeita ao tipo de receptores que estimulam. Embora as fibras pré-ganglionares simpáticas e parassimpáticas estimulem receptores nicotínicos presentes nos gânglios (inclusivamente na medula adrenérgica), estes sistemas diferem no que respeita aos receptores estimulados pelas fibras pós-ganglionares. Deste modo, as fibras pós-ganglionares parassimpáticas estimulam receptores muscarínicos enquanto que as fibras pós-ganglionares simpáticas estimulam receptores adrenérgicos.

1.1.1.3. Funções do Sistema Nervoso Autónomo

Apesar das diferenças acima demonstradas, as acções dos sistemas simpático e parassimpático são integradas de forma a manter a homeostase do organismo (5, 9). Por conseguinte, os impulsos de uma divisão estimulam as actividades de determinado órgão, enquanto que os impulsos da outra divisão as inibem. Contudo, a divisão estimuladora tanto pode ser a simpática como a parassimpática, dependendo do órgão em questão (5). Ao nível do coração, por exemplo, os impulsos simpáticos aumentam a actividade cardíaca, enquanto que os impulsos parassimpáticos a diminuem; por outro lado, as actividades digestivas são aumentadas por estímulos parassimpáticos e inibidas por estímulos simpáticos (5).

O sistema parassimpático está, então, primariamente relacionado com as actividades que conservam e restauram a energia corporal (5). Deste modo, está organizado no sentido de produzir descargas discretas e localizadas para a manutenção das funções orgânicas durante os períodos de actividade mínima. Por exemplo, os impulsos parassimpáticos nas glândulas digestivas e músculo liso do tracto gastrointestinal dominam, normalmente, em relação aos impulsos

simpáticos; deste modo, os alimentos que fornecem energia podem ser digeridos e absorvidos pelo organismo. Este sistema é responsável pela diminuição da frequência cardíaca e da pressão sanguínea, pela estimulação dos movimentos e das secreções gastrointestinais, pelo auxílio na absorção de nutrientes, pela protecção da retina da excessiva luminosidade e pelo esvaziamento da bexiga e do recto (5).

O sistema simpático, pelo contrário, está essencialmente relacionado com processos que envolvem o consumo de energia (5). Quando o organismo está em homeostase, a principal função do sistema simpático é contrariar os efeitos parassimpáticos de forma suficiente para efectuar os normais processos que requerem energia. Contudo, em situações de stress extremo, o sistema simpático domina o parassimpático. Confrontado com stress, o organismo fica alerta e capaz de acções inusuais. Deste modo, na ausência do sistema simpático, a temperatura corporal não poderia ser controlada para responder a uma alteração da temperatura ambiente; a concentração sanguínea de glicose não era aumentada em resposta a uma necessidade urgente; não se verificavam respostas vasculares compensatórias face a situações de hemorragia, privação de oxigénio, excitação e exercício; seriam suprimidos os componentes simpáticos das reacções instintivas ao medo e ao perigo; seriam evidenciadas outras deficiências graves nos mecanismos protectores do organismo (5).

Pelo que foi acima referido, podem classificar-se as acções das catecolaminas e agentes simpaticomiméticos em sete tipos diferentes e vastos:

- Acção excitatória periférica em determinados tipos de musculatura lisa, como a existente nos vasos sanguíneos que irrigam a pele, rim e membranas mucosas, e nas células glandulares, como as presentes nas glândulas salivares e sudoríparas;
- Acção inibitória periférica em determinados tipos de músculo liso, como o presente na árvore brônquica e nos vasos sanguíneos que irrigam o músculo-esquelético;
- Acção excitatória cardíaca, responsável pelo aumento do ritmo cardíaco e da força contráctil;

- Acções metabólicas, como, por exemplo, o aumento da taxa de glicogenólise no fígado e músculo, e a libertação de ácidos gordos do tecido adiposo;
- Acções endócrinas, como a modulação da secreção de insulina, renina e hormonas pituitárias;
- Acções no SNC, como a estimulação respiratória. Determinados compostos podem, também, provocar um aumento da vigília e da actividade psicomotora e uma redução do apetite;
- Acções pré-sinápticas que resultam quer da inibição, quer da estimulação da libertação de neurotransmissores.

Nem todos os compostos simpaticomiméticos demonstram todos os tipos de acção acima mencionados com a mesma intensidade; contudo, muitas das diferenças são apenas quantitativas (5). Além disso, o conhecimento das propriedades farmacológicas das catecolaminas e compostos relacionados depende da correcta compreensão da classificação, distribuição e mecanismo de acção dos vários subtipos de receptores adrenérgicos (abordados de forma pormenorizada mais à frente nesta dissertação).

1.1.2 Neuroquímica das Catecolaminas

1.1.2.1. Biossíntese das Catecolaminas

A síntese das catecolaminas a partir da tirosina foi pela primeira vez proposta por Blaschko, em 1939. O processo enzimático envolvido na formação destes compostos foi, então, completamente caracterizado e encontra-se representado na [Figura 1.1](#) (5, 10).

As enzimas envolvidas neste processo foram identificadas, clonadas, purificadas e caracterizadas, o que permitiu uma análise detalhada da sua cinética, da especificidade dos substratos e da necessidade de co-factores, assim como o desenvolvimento de inibidores (5, 10). De realçar que estas enzimas não são completamente específicas e, desta forma, outras substâncias endógenas,

assim como determinados fármacos, podem ser substratos nos vários passos do processo (a dopa descarboxilase, por exemplo, converte a DOPA em dopamina e a metildopa em α -metildopamina a qual é convertida no “falso transmissor” α -metilnoradrenalina pela dopamina β -hidroxilase (DBH) (5).

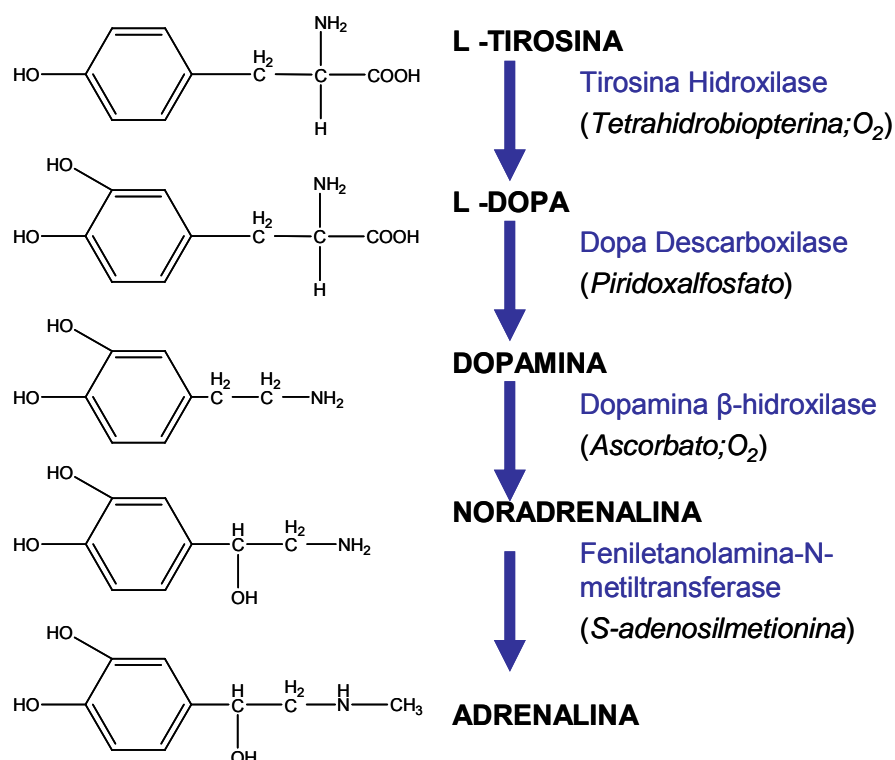


Figura 1.1 -Via biossintética das catecolaminas [adaptado de (5)]

(As enzimas envolvidas estão ilustradas a azul e os co-factores indispensáveis a *itálico*. O passo final ocorre apenas na medula adrenal e em algumas vias neuronais no tronco cerebral contendo adrenalina)

O precursor na síntese de todas as catecolaminas é o aminoácido tirosina. A sua hidroxilação é, normalmente, considerada a etapa limitante na biossíntese das catecolaminas, sendo a enzima responsável – tirosina hidroxilase (TH) – activada por estimulação dos nervos adrenérgicos ou da medula adrenérgica e inibida por feedback pelos compostos catecóis (5, 9, 10). A TH, presente em

todas as células que sintetizam catecolaminas, é uma oxidase de função mista que usa o oxigénio molecular e a tirosina como substratos, e a biopterina como co-factor. Este homotetrâmero catalisa a adição de um grupo hidroxilo na posição *meta* da tirosina, formando 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA). Esta reacção ocorre no citoplasma dos terminais nervosos simpáticos pós-ganglionares (5, 9). A TH pode, igualmente, hidroxilar a fenilalanina formando tirosina, a qual é posteriormente convertida a L-DOPA; esta via sintética alternativa pode ter um enorme significado em pacientes afectados por fenilcetonúria, condição na qual a actividade da fenilalanina hidroxilase se encontra reprimida. O co-factor indispensável à actividade da TH - a biopterina - pode ser encontrado, ao nível dos neurónios contendo catecolaminas, em concentrações sub-saturantes desempenhando, deste modo, um importante papel na biossíntese de adrenalina. Apesar da TH ser primariamente uma enzima solúvel, podem ocorrer interacções com os constituintes da membrana (a fosfatidilserina, polianiões como o sulfato de heparina) que alteram as características cinéticas da enzima. Existem inibidores competitivos da TH como é o caso dos análogos da tirosina, de que é exemplo a α -metil-*p*-tirosina (AMPT) (10). Esta enzima é um substrato da proteína cinase C e da proteína cinase dependente do AMPc e sensível ao Ca^{2+} -calmodulina, podendo a fosforilação catalisada pelas cinases estar associada com o aumento da actividade da TH. Este facto constitui um importante mecanismo de rápido aumento da biossíntese de catecolaminas como resposta a uma hiperestimulação nervosa (5). Existe um outro mecanismo que, juntamente com o anterior, contribui para a manutenção dos níveis de catecolaminas em resposta à libertação destes neurotransmissores e que está relacionado com a expressão tardia do gene da TH após uma estimulação nervosa.

A segunda etapa na biossíntese das catecolaminas é mediada pela DOPA descarboxilase (DDC), a qual catalisa a remoção do grupo carboxilo da DOPA, formando-se, deste modo, DA. Este passo ocorre, tal como o anterior, no citoplasma dos terminais nervosos simpáticos pós-ganglionares (9). Esta enzima dependente da piridoxina apresenta um baixo *K_m* e um elevado *V_{max}* relativamente à L-DOPA, de que resulta uma eficiente conversão da L-DOPA endógena em DA (11). A DDC é muitas vezes designada de descarboxilase dos

aminoácidos aromáticos devido à sua capacidade de descarboxilar o 5-hidroxitriptofano [precursor da 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina)], assim como outros aminoácidos aromáticos. Esta enzima encontra-se amplamente distribuída no organismo, podendo ser encontrada ao nível dos neurónios que contêm catecolaminas e 5-HT, assim como em tecidos não neuronais como o rim e os vasos sanguíneos. Ao nível dos neurónios contendo DA, esta enzima constitui a etapa final da via biossintética.

No caso dos neurónios que sintetizam NA ou ADR, a enzima DBH é a responsável pela fase seguinte do processo de síntese das catecolaminas. Aproximadamente metade da DA produzida no citoplasma é transportada activamente para o interior das vesículas de armazenamento contendo DBH; a restante DA não captada para as vesículas é desaminada a ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), que é depois O-metilado a ácido homovanílico (HVA) (5), como será mais à frente abordado em pormenor. Deste modo, a DA é activamente acumulada nas vesículas de armazenamento localizadas nos terminais nervosos simpáticos e, durante este processo de transporte, é β -hidroxilada pela DBH que está associada à vesícula de armazenamento adrenérgica (9). Esta enzima é, tal como a TH, uma oxidase de função mista que recorre ao oxigénio molecular para formar o grupo hidroxilo que será adicionado ao carbono β da cadeia lateral da DA (12). O ascorbato é o co-factor indispensável o qual, sendo reduzido a dihidroascorbato durante a reacção, constitui a fonte de electrões. A DBH contém Cu^{2+} , essencial na transferência de electrões durante a reacção, pelo que os seus quelantes, como o dietilditiocarbamato, são potentes inibidores da DBH. A DBH é uma glicoproteína tetramérica que se concentra no interior das vesículas que armazenam catecolaminas, sendo que a maioria da enzima se encontra ligada à membrana vesicular interna. A DBH é, então, libertada dos nervos e da glândula adrenal juntamente com as catecolaminas, sendo assim encontrada no plasma. O produto da reacção catalisada pela DBH, a noradrenalina, é mantido no interior das vesículas, em associação com o ATP, até à sua libertação aquando da chegada de um potencial de acção ao terminal nervoso simpático. Esta enzima representa, deste modo, a enzima terminal na biossíntese de catecolaminas nos neurónios

simpáticos pós-ganglionares. Desta forma, os nervos adrenérgicos libertam apenas NA como neurotransmissor (9).

A biossíntese da ADR é catalisada pela enzima feniletanolamina N-metiltransferase (*phenylethanolamine N-methyltransferase*; PNMT) que está presente ao nível das células medulares adrenais, para as quais a ADR é a neuro-hormona primária, e ao nível de um pequeno grupo de neurónios no tronco cerebral (*brainstem*) que utilizam a ADR como neurotransmissor (10). A PNMT promove a transferência de um grupo metilo da S-adenosilmetionina para o azoto da NA dando, conseqüentemente, origem à formação de uma amina secundária, a ADR (13). Por conseguinte, esta enzima causa a N-metilação da NA, que abandona as vesículas (provavelmente por difusão), com conseqüente formação de ADR no citoplasma. A ADR formada é captada novamente para o interior vesículas para ser armazenada e mantida até à sua libertação.

1.1.2.2. Armazenamento e Libertação das Catecolaminas

As catecolaminas são armazenadas em pequenas vesículas que estão presentes em elevada densidade ao nível dos terminais nervosos. Naturalmente, são apenas encontradas no citosol baixas concentrações de catecolaminas livres, onde podem ser metabolizadas por enzimas como, por exemplo, a monoamino oxidase (MAO). Deste modo, com o seu armazenamento no interior das vesículas, assegura-se a sua libertação regular, impedindo o metabolismo intraneuronal destes neurotransmissores, assim como a sua saída para o exterior da célula (5). Por este motivo, e como anteriormente referido, após a conversão da tirosina a L-DOPA e L-DOPA a DA no citosol, a DA é recaptada para o interior de vesículas de armazenamento. No caso de neurónios que contêm NA, a β -hidroxilação final ocorre já no interior das referidas vesículas.

Relativamente à glândula adrenal, a NA sofre, como já referido, a N-metilação, catalisada pela PNMT, ao nível do citoplasma, seguindo-se o seu transporte para o interior de grânulos designados cromafins para armazenamento. Estas vesículas contêm concentrações extremamente elevadas de catecolaminas,

ácido ascórbico e ATP, além de proteínas como as cromograninas (proteínas acídicas) e a dopamina β -hidroxilase. A medula adrenérgica possui, deste modo, dois tipos de células: células que contêm NA e células que contêm predominantemente ADR, apresentando esta última população celular a enzima PNMT (nestas células a NA formada nos grânulos abandona estas estruturas e é metilada a ADR no citoplasma, a qual entra novamente nos grânulos cromafins onde é armazenada até à sua libertação) (5). Nos adultos, a ADR contribui para 80% das catecolaminas presentes na medula adrenérgica, com a NA a constituir a restante percentagem (5, 9).

As catecolaminas encontram-se no interior das vesículas numa concentração na ordem dos 0,5 M, na forma de um complexo com ATP e cromograninas (10). O mecanismo responsável pela sua concentração no interior das referidas vesículas é dependente de ATP e está associado à bomba de prótons. Por conseguinte, a captação de catecolaminas e ATP pelos grânulos cromafins isolados parece ser desencadeada pelos gradientes de potencial e pH que se estabelecem por uma translocase de prótons dependente de ATP (por cada molécula de amina captada ocorre o efluxo de dois iões H^+) (5). Os transportadores das monoaminas são relativamente inespecíficos e podem transportar uma variedade de aminas biogénicas, como a tiramina, triptamina e as anfetaminas, as quais podem competir com as catecolaminas endógenas para os locais de armazenamento vesiculares (10). A reserpina, sendo um inibidor irreversível específico do transportador vesicular de aminas, bloqueia a capacidade das vesículas concentrarem as aminas causando uma profunda diminuição do nível de catecolaminas endógenas nas terminações nervosas e no cérebro (5, 10). A reserpina tem, então, como efeito a inibição da captação de DA e outras catecolaminas para o interior das vesículas.

Estas vesículas desempenham um duplo papel uma vez que mantêm o nível de catecolaminas no terminal nervoso disponível para libertação e intervêm na mediação desse mesmo processo de libertação. Consequentemente, quando um potencial de acção atinge o terminal nervoso, ocorre a abertura dos canais de cálcio, permitindo o seu influxo no terminal. O consequente aumento de cálcio intracelular promove a fusão das vesículas com a membrana neuronal, as quais

libertam os seus conteúdos solúveis, incluindo NA, ATP e DBH, no espaço extraneuronal (14). Da mesma forma, a entrada de cálcio desempenha uma função essencial no acoplamento do impulso nervoso, com a libertação de neurotransmissores nos terminais nervosos adrenérgicos (5). O facto de a DBH ser libertada simultânea e proporcionalmente com a NA permitiu estabelecer que a libertação ocorre por exocitose, uma vez que não se espera que as proteínas sofram difusão através da membrana. Desta forma, a libertação por exocitose dos neurónios simpáticos pode ser a fonte de DBH encontrada no plasma e fluido cerebrospinal. Compostos que agem indirectamente como simpaticomiméticos, como a anfetamina, libertam catecolaminas por um mecanismo que não é dependente do cálcio nem está associado com a libertação de DBH, uma vez que mobilizam estes compostos das vesículas de armazenamento, com a consequente perda de neurotransmissor nos terminais nervosos (ver 1.1.3).

1.1.2.3. Modulação da Síntese e Libertação das Catecolaminas

A concentração de catecolaminas nos terminais nervosos permanece relativamente constante uma vez que, apesar das marcadas flutuações na actividade dos neurónios catecolaminérgicos, existem mecanismos reguladores eficientes que modulam a sua síntese e libertação (15).

Um dos principais processos de modulação decorre das alterações, a longo prazo, nas quantidades de TH e DBH presentes nos terminais nervosos que podem afectar a síntese de catecolaminas. Deste modo, após o aumento prolongado da actividade neuronal simpática, surge um aumento, ao nível da pericaria neuronal, da quantidade de mRNA que codifica para a TH e DBH; a DDC não parece ser modulada por este processo (5, 10). As novas enzimas sintetizadas são, posteriormente, transportadas ao longo do axónio na direcção do terminal nervoso. Desta forma, alterações na taxa de síntese de TH e DBH constituem um mecanismo de modulação da síntese de catecolaminas em resposta a alterações persistentes da actividade neuronal.

Adicionalmente, existem dois mecanismos a operar ao nível do terminal nervoso que desempenham importantes papéis na modulação, a curto prazo, da síntese de catecolaminas e que respondem a alterações momentâneas da actividade neuronal (16). No primeiro mecanismo, a enzima limitante da via biossintética, a TH, é modulada pelo produto final. Por conseguinte, as catecolaminas intraneuronais livres inibem a posterior actividade desta enzima por competição pelo local de ligação do co-factor. Pelo contrário, como consequência da actividade neuronal ocorre a libertação das catecolaminas, com a consequente diminuição das concentrações citoplasmáticas e desinibição da enzima (15). O outro mecanismo modulador está relacionado com o facto da despolarização dos terminais catecolaminérgicos activar a TH. As características cinéticas da enzima alteram-se de forma a ter maior afinidade para o co-factor e menor sensibilidade à inibição por parte do produto final. A activação desta enzima está, como referido anteriormente, associada com a sua fosforilação, a qual pode ser induzida pela proteína cinase dependente de cálcio (PKC), pela proteína cinase dependente de AMPc (PKA) e por proteínas cinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKs), resultando no aumento da actividade da TH (5, 17).

Além da *síntese de novo* existe um outro mecanismo importante na reposição da NA armazenada nos terminais das fibras adrenérgicas e que está relacionado com a recaptação, por transporte activo, do neurotransmissor previamente libertado para o fluído extracelular. Este processo de recaptação é responsável pela inibição dos efeitos dos impulsos adrenérgicos na maioria dos órgãos. Para que ocorra a recaptação da NA para os terminais nervosos, de forma a manter o gradiente de concentração deste neurotransmissor no interior das vesículas, são necessários, pelo menos, dois sistemas de transporte distintos mediados por transportadores: um do fluído extracelular para o citoplasma (através da membrana axoplasmática) e outro do citoplasma para as vesículas de armazenamento (através dos transportadores anteriormente abordados) (5).

Desta forma se conclui que as fibras adrenérgicas conseguem assegurar a libertação de catecolaminas durante prolongados períodos de estimulação sem esgotar as suas reservas, desde que a síntese e a captação do neurotransmissor não estejam inibidas.

1.1.2.4. Receptores das Catecolaminas

1.1.2.4.1 Receptores Adrenérgicos

Os receptores adrenérgicos constituem uma família de proteínas que se relacionam, estrutural e funcionalmente, com receptores de diversas hormonas e neurotransmissores acoplados à proteína G. Estudos efectuados com ligandos, com marcação direccionada a um local e estudos de mutagénese revelaram que as regiões conservadas que atravessam a membrana são cruciais para a ligação dos ligandos, e parecem criar esse local de ligação (5).

O conhecimento das propriedades dos diferentes tipos de receptores adrenérgicos é fundamental para a compreensão dos efeitos marcadamente diversos das catecolaminas e dos agentes simpaticomiméticos relacionados. Após a activação de todos os tipos de receptores adrenérgicos, as respostas subsequentes parecem resultar de efeitos mediados por proteínas G na geração de segundos mensageiros e na actividade de canais iónicos. Desta forma, estes sistemas envolvem três proteínas que interactivam entre si: o receptor, a proteína G acoplada e as enzimas efectoras ou canais iónicos. Consequentemente, através do controlo da síntese ou libertação de diversos sistemas de segundos mensageiros, estes diferentes receptores adrenérgicos (apesar da sua semelhança estrutural) regulam processos fisiológicos diferentes (5).

Um estudo efectuado por Ahquist em 1948, no qual se constatou que a ADR, a NA e outros agonistas tinham a capacidade de regular diversos processos fisiológicos, levou a que, pela primeira vez, se colocasse a hipótese de existência de mais de um receptor adrenérgico. Este autor verificou, por exemplo, que estes compostos podiam causar contracção e relaxamento da musculatura lisa, dependendo do local, da dose e do agente em questão. Por conseguinte, com base nestas constatações, Ahquist propôs a designação de α e β para os receptores no músculo liso onde as catecolaminas provocam respostas excitatórias e inibitórias, respectivamente (existe uma excepção, a nível intestinal, no qual ocorre geralmente um relaxamento por activação dos receptores α e β -adrenérgicos) [ver em (5)].

Estes dois tipos de receptores (e os subtipos correspondentes, que serão a seguir abordados) regulam diferentes processos fisiológicos e, adicionalmente, têm afinidades diferentes para as diversas catecolaminas. Deste modo, a sua maior ou menor abundância em determinado órgão define o tipo de efeito que se vai observar após um estímulo adrenérgico (5).

1.1.2.4.1.1 Receptores α -Adrenérgicos

A heterogeneidade dos receptores α -adrenérgicos foi constatada, tendo sido efectuada uma distinção inicial baseada nas questões anatómicas e funcionais levantadas quando se verificou que a NA e outros agonistas α -adrenérgicos eram capazes de inibir a libertação de NA dos neurónios. Verificou-se, de facto, um aumento marcado na quantidade de NA libertada em cada impulso nervoso quando os nervos simpáticos eram estimulados na presença de determinados antagonistas α -adrenérgicos. Definiu-se, deste modo, que este efeito de feedback inibitório da NA na sua própria libertação seria mediado por receptores α farmacologicamente distintos dos clássicos receptores α pós-sinápticos (5). Por conseguinte, os receptores α pré-sinápticos foram designados por α_2 , enquanto que os receptores α pós-sinápticos foram designados por α_1 (18). Neste momento, apesar de existirem poucas evidências que sugiram a possibilidade dos receptores α_1 actuarem ao nível pré-sináptico no sistema nervoso autónomo, é perfeitamente claro que os receptores adrenérgicos α_2 estão também presentes em locais pós-juncionais ou não juncionais de diversos tecidos. Deste modo, abandonou-se o conceito anatómico de receptores adrenérgicos α_1 pós-juncionais e α_2 pré-juncionais a favor de uma classificação farmacológica e funcional (5).

A utilização de agonistas e antagonistas radiomarcados para marcação dos receptores α , a nível cerebral e dos tecidos periféricos, permitiu verificar que as propriedades de ligação destes receptores são essencialmente as mesmas no cérebro e na periferia. Alguns tecidos possuem apenas receptores pós-sinápticos α_1 , outros pós-sinápticos α_2 e alguns órgãos apresentam os dois tipos. Ao nível das diferentes regiões cerebrais as proporções de receptores α_1 e α_2 também

variam e permanecem por clarificar as consequências fisiológicas dos dois tipos de receptores α nesses locais (10).

Resultados de estudos farmacológicos, fisiológicos e envolvendo radioligandos sugeriram que existiriam múltiplos tipos de receptores α_1 e α_2 , sendo que as diferenças de importância clínica se verificaram ao nível das propriedades dos receptores α juncionais e extra-juncionais (10). Posteriormente, tal foi confirmado através da clonagem e análise sequencial destes receptores. Deste modo, definiram-se três receptores adrenérgicos α_1 farmacologicamente distintos - α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} - os quais apresentavam sequências e distribuições tecidulares distintas. Em algumas situações, o receptor α_{1D} foi associado à activação de canais de cálcio enquanto que o receptor α_{1B} activa a fosfolipase C específica do fosfoinositol (*phosphoinositide-specific phospholipase C; PI-PLC*), resultando na libertação de diacilglicerol e trifosfato de inositol. Foram, igualmente, definidos e clonados três subtipos de receptores adrenérgicos α_2 - α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} - sabendo-se que existem padrões de distribuição distintos destes subtipos ao nível cerebral. Os três subtipos de receptores α_2 estão associados à inibição da actividade da adenilciclase (10).

A sequência de aminoácidos dos genes dos seis receptores α -adrenérgicos confirma o paradigma já estabelecido dos receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembranares. Adicionalmente, convém salientar que as propriedades funcionais dos subtipos de receptores α_1 e α_2 não estão, ainda, devidamente aferidas (5).

1.1.2.4.1.2 Receptores β -Adrenérgicos

Os receptores β -adrenérgicos subdividem-se em β_1 e β_2 . Esta divisão tornou-se evidente ao verificar-se que a ADR e a NA eram essencialmente equipotentes em determinados locais, enquanto que noutros a ADR era 10 a 50 vezes mais potente que a NA (10). Os receptores β_1 predominam no coração e no córtex cerebral, enquanto que os receptores β_2 predominam no pulmão e cerebelo. Contudo, em muitas situações, os receptores adrenérgicos β_1 e β_2 coexistem no

mesmo tecido, mediando por vezes o mesmo efeito fisiológico. Foi, posteriormente, isolado o gene que codifica para o terceiro receptor β -adrenérgico (designado por β_3) o qual, por se ter demonstrado 10 vezes mais sensível à NA que à ADR e resistente ao bloqueio por antagonistas, parece mediar as respostas às catecolaminas em locais com características farmacológicas atípicas, como por exemplo o tecido adiposo. O receptor β_3 em humanos foi já correlacionado com a obesidade hereditária, com o controlo do metabolismo lipídico e com o desenvolvimento de diabetes. Este terceiro subtipo apresenta, deste modo, propriedades farmacológicas distintas dos subtipos β_1 e β_2 (10). No entanto, os três receptores β -adrenérgicos partilham aproximadamente 60% da identidade da sequência de aminoácidos nos presumíveis domínios transmembranares, onde se encontra o local de ligação da ADR e da NA (5).

Todos os receptores β -adrenérgicos estimulam a adenilciclase através da interacção com a proteína Gs (5). A estimulação desta proteína, ao nível dos receptores β adrenérgicos do coração, origina a formação de AMPc pela activação da adenilciclase. Posteriormente, o AMPc formado activa a proteína cinase A que, por fosforilação ao nível do sarcolema, do retículo sarcoplasmático e da miosina, origina um aumento do Ca^{2+} citosólico e uma maior velocidade na regeneração das cabeças de miosina. Ao nível cardíaco, as catecolaminas exercem, essencialmente, os seus efeitos mediante activação dos receptores β , apesar de estarem igualmente presentes os receptores adrenérgicos α_1 (19). No coração, a densidade destes receptores β é inversamente proporcional à densidade da enervação simpática, encontrando-se em menor quantidade nas aurículas e em maior quantidade no apex do ventrículo esquerdo. Ao nível do coração humano parece existir uma igual densidade de receptores β_1 e β_2 (19). Como consequência da estimulação destes receptores ocorre um aumento da contractilidade, do ritmo e da estimulação eléctrica. Os efeitos inotrópicos parecem ser mediados pelos receptores β_1 e α_1 (presentes essencialmente nos ventrículos), ao passo que os efeitos cronotrópicos parecem ocorrer via receptores β_1 e β_2 (presentes essencialmente nas aurículas) (19).

Convém, por último, salientar que pequenas diferenças na sequência de aminoácidos podem, por vezes, levar a significativas alterações na especificidade

farmacológica de um receptor expresso e que existe, claramente, a possibilidade de permanecerem por identificar receptores adicionais das catecolaminas (10).

1.1.2.4.2 Receptores Dopaminérgicos

A DA é a principal catecolamina no sistema nervoso central, onde está envolvida na regulação de diversas funções, incluindo a actividade locomotora, a cognição, a emoção, o afecto, a ingestão de alimentos e a secreção neuroendócrina (20, 21). Esta catecolamina desempenha, ainda, múltiplos papéis na periferia como modulador da função cardíaca, da libertação de catecolaminas, da secreção hormonal, do tónus vascular, da função renal e da motilidade gastrointestinal (20).

O sistema dopaminérgico tem sido o alvo de inúmeras pesquisas ao longo dos últimos 30 anos, principalmente por muitas alterações na neurotransmissão dopaminérgica estarem envolvidas, directa ou indirectamente, em diversas disfunções cerebrais, como a doença de Parkinson e a esquizofrenia. Antagonistas dos receptores dopaminérgicos têm sido desenvolvidos para bloquear as alucinações e ilusões que ocorrem em pacientes esquizofrénicos, enquanto que os agonistas dos receptores dopaminérgicos são efectivos em suavizar a hipocinesia da doença de Parkinson (20, 21).

As várias acções da DA são mediadas por receptores específicos (20, 21). A primeira evidência para a existência de receptores dopaminérgicos no SNC surgiu em 1972 mediante estudos bioquímicos que demonstraram que a DA era capaz de estimular a adenilciclase (22). Com base em evidências farmacológicas e bioquímicas foi sugerida a existência de múltiplos locais de ligação da dopamina e, em 1978, foi proposta a existência de duas populações discretas de receptores dopaminérgicos, uma positivamente acoplada à adenilciclase e a outra independente deste efector (23). Keabian and Calne (1979) sugeriram posteriormente a classificação de receptores D₁ e D₂ com base na farmacologia e no acoplamento à adenilciclase das populações observadas (24). A evidência de que os receptores D₂ inibiam a adenilciclase ao nível da pituitária surgiu no início

dos anos oitenta (25, 26). Estudos posteriores com ligação de radioligandos confirmaram a existência de receptores D_1 e D_2 e o seu acoplamento diferencial à adenilciclase.

Durante uma década a classificação dos receptores dopaminérgicos em duas populações serviu de base ao estudo destes receptores. Contudo, após o aparecimento de procedimentos de clonagem genética, três novos subtipos de receptores da DA foram caracterizados ao longo dos últimos anos, os quais foram designados de receptores D_3 (27), D_4 (28) e D_5/D_{1b} (29, 30). No entanto, estudos estruturais, farmacológicos e bioquímicos detalhados demonstraram que todos os receptores dopaminérgicos se enquadram numa das duas categorias de receptores inicialmente reconhecidas (31-34). O sistema de classificação desenvolvido no fim dos anos setenta permanece, deste modo, válido, sendo os receptores D_1 e D_5/D_{1b} classificados como receptores do tipo D_1 e os receptores D_2 , D_3 e D_4 classificados como receptores do tipo D_2 . O receptor D_{1b} , originalmente designado com base na sua elevada homologia com o receptor D_1 , é comumente designado como receptor D_5 (20, 21).

O acoplamento dos receptores dopaminérgicos a vias de segundos mensageiros tem sido objecto de intensa pesquisa desde o momento do reconhecimento da sua existência. Deste modo, da referida pesquisa, concluiu-se que todos os receptores do tipo D_1 identificados até ao momento estimulam a síntese de AMPc, o qual parece constituir a principal via de sinalização deste grupo de receptores. Contudo, este grupo de receptores é, também, capaz de estar acoplado à estimulação da hidrólise do inositolfosfato, à inibição do trocador de Na^+/H^+ e de aumentar o efluxo de K^+ . Os receptores do tipo D_2 são, igualmente, capazes de modelar numerosas vias de segundos mensageiros, além da redução dos níveis de AMPc. Entre essas vias de sinalização celular englobam-se a modulação de canais iónicos, a modulação do trocador de Na^+/H^+ , a libertação de ácido araquidónico, a hidrólise do inositol fosfato e a modulação do crescimento e diferenciação celular. Para cada tipo de receptor pertencente a este grupo, o acoplamento a segundos mensageiros é dependente do tipo de célula na qual é expresso e nem todos os receptores podem afectar todas estas vias de sinalização (20, 21).

1.1.2.5. Inactivação e Catabolismo das Catecolaminas

As acções das catecolaminas podem ser concluídas pelos seguintes processos:

- Recaptação das catecolaminas pelos terminais nervosos;
- Diluição, por difusão, das catecolaminas para o exterior da fenda sináptica e sua captação nos locais extraneuronais;
- Transformação metabólica das catecolaminas, onde intervêm a MAO e a catecol-O-metiltransferase (COMT), que constituem duas importantes enzimas nas etapas iniciais dessa transformação.

O processo de captação das catecolaminas foi inicialmente descrito por Axelrod ao verificar que, após injeção intravenosa de NA radioactiva, esta rapidamente se acumulava nos tecidos em proporção directa com a densidade de inervação simpática do tecido (5, 10). Estudos posteriores demonstraram que este processo de acumulação de aminas (pelas membranas axoplasmáticas) é dependente de Na^+ e Cl^- e é mediado por um transportador que se encontra localizado na membrana externa dos neurónios catecolaminérgicos, designado por sistema de captação 1 (*uptake-1*) (5, 10). Este transportador apresenta elevada afinidade para a NA, menor afinidade para a ADR e a ISO não se apresenta como substrato para este sistema (5, 10).

Recorrendo a técnicas de purificação proteica e a técnicas de clonagem da expressão proteica foi possível identificar transportadores na membrana plasmática altamente específicos dos neurotransmissores, como por exemplo, transportadores com elevada afinidade para a DA, NA, 5-HT e diversos aminoácidos transmissores (5). Foi já encontrado, apenas em neurónios noradrenérgicos, um processo de transporte selectivo para a NA, enquanto que em neurónios dopaminérgicos foi encontrado um transportador com especificidade diferente (10). Adicionalmente, estes transportadores da membrana plasmática parecem ter maior afinidade para o substrato, comparativamente com os transportadores vesiculares, podendo constituir-se como alvos de fármacos específicos como a fluoxetina (transportador da 5-HT) e cocaína (transportador da DA) (5).

Os transportadores fazem parte da grande família dos neurotransportadores e apresentam locais consenso para a fosforilação, embora a importância da fosforilação não tenha sido ainda elucidada (10). O processo de recaptação (sistema de captação 1) depende de energia, uma vez que pode ser inibido por incubação a baixas temperaturas ou por inibidores metabólicos (10). Estes requisitos de energia reflectem a associação do processo de recaptação ao gradiente de Na^+ através da membrana, embora este processo seja também dependente de Cl^- . Desta forma, fármacos com a capacidade de inibirem a Na^+, K^+ -ATPase ou fármacos com capacidade de provocar a abertura dos canais de sódio inibem o processo de recaptação. Esta associação da recaptação ao gradiente de Na^+ pode apresentar um importante significado fisiológico, uma vez que o transporte cessa temporariamente no momento da libertação de catecolaminas induzida por despolarização (10). Deste modo, enquanto que o transporte através da membrana vesicular requer prótons e é inibido por fármacos como a reserpina, este composto não inibe a recaptação neuronal, a qual é dependente de Na^+ (10).

Adicionalmente, este mecanismo de transporte das catecolaminas (sistema de captação 1) pode ser selectivamente inibido por fármacos como os antidepressivos tricíclicos e por drogas como a cocaína (5, 10). Adicionalmente, existem diversas feniletilaminas (como a anfetamina) que são substratos do transportador, concentrando-se assim nos neurónios catecolaminérgicos e competindo com as catecolaminas para o transporte. Uma vez captado através da membrana neuronal, este composto pode ser captado para o interior das vesículas de armazenamento e ser libertado em vez da NA (estas substâncias são designadas por falsos transmissores).

Existe, ainda, um sistema de transporte extraneuronal de aminas, designado por sistema de captação 2 (*uptake-2*), que apresenta pouca afinidade para a NA, maior afinidade para a ADR e ainda maior para a ISO. Trata-se de um processo ubíquo presente nas células gliais, hepáticas, miocárdicas, assim como noutros tipos de células. Este sistema de transporte, ao contrário do sistema de captação 1, não é inibido pelos antidepressivos tricíclicos nem pela cocaína e, a menos que o mecanismo neuronal esteja bloqueado, parece ter uma importância fisiológica

relativamente pequena. Parece, contudo, ser mais importante na distribuição das catecolaminas circulantes do que na remoção dos neurotransmissores libertados nas terminações nervosas adrenérgicas (5).

Após a recaptação das catecolaminas um dos processos de término das suas acções decorre como consequência da sua transformação metabólica. Devido à natureza extensa e prolongada da investigação efectuada na área das catecolaminas e dos sistemas catecolaminérgicos deveria esperar-se que as vias do metabolismo das catecolaminas estivessem presentemente bem conhecidas e claramente descritas. No entanto, incorrecções e mal entendidos na área são ainda frequentes e persistentes (35). Uma das áreas em que surgem incorrecções diz respeito ao facto de, muitas vezes, se considerar que as catecolaminas são metabolizadas em locais distantes dos seus locais de síntese e libertação, após a sua entrada no fluído extracelular ou até mesmo na corrente sanguínea. De facto, grande parte do metabolismo das catecolaminas ocorre nas mesmas células em que estas aminas são produzidas (35). Adicionalmente, e igualmente importante, na sua maioria, o metabolismo ocorre independentemente da libertação exocitótica das catecolaminas e apenas uma pequena fracção dos metabolitos das catecolaminas se formam a partir das catecolaminas circulantes (35).

A metabolização das catecolaminas ocorre, tal como já referido, pela acção conjunta de duas enzimas, a MAO e a COMT, as quais se constituem como as enzimas primariamente responsáveis pela inactivação das catecolaminas ([Figura 1.2](#)) (5, 10). Estas duas enzimas são ubíquas no organismo, sendo que as concentrações mais elevadas são encontradas no fígado e rim; contudo, ao nível dos neurónios adrenérgicos pouca ou nenhuma COMT pode ser encontrada (5). A acção destas enzimas sobre as catecolaminas parece ter pouca importância ao nível neuronal se o sistema de captação 1 estiver activo. Contudo, as catecolaminas captadas (ou libertadas das vesículas) para o interior dos neurónios podem ser metabolizadas pela MAO. Por outro lado, a COMT tem uma acção mais preponderante no fígado e no rim, metabolizando as catecolaminas, endógenas e administradas, presentes na circulação sanguínea.

Estas duas enzimas diferenciam-se no que respeita à sua localização celular, com a MAO associada principalmente à superfície externa das mitocôndrias (10)

(incluindo as presentes nos terminais nervosos) e a COMT localizada predominantemente no citoplasma. Estas diferenças constituem-se, deste modo, como importantes factores tanto na determinação de quais as vias metabólicas principais seguidas pelas catecolaminas nas diversas circunstâncias, como na explicação dos efeitos de alguns fármacos (5).

A MAO é uma enzima que contém flavina e catalisa a desaminação oxidativa das catecolaminas aos aldeídos correspondentes; estes podem posteriormente ser convertidos a ácidos, pela aldeído desidrogenase, ou a glicóis, pela aldeído redutase (10). Devido à sua localização intracelular esta enzima desempenha um papel importante e estratégico na inactivação das catecolaminas livres no terminal nervoso e que, por isso, não se encontram protegidas nas vesículas de armazenamento (10). Desta forma, xenobióticos que interferem com o armazenamento vesicular (como a reserpina e compostos que agem indirectamente como simpaticomiméticos, como as anfetaminas) causam aumentos acentuados nos metabolitos desaminados. Foram identificadas duas isoenzimas da MAO, as quais apresentam diferentes especificidades de substrato e que são encontradas em percentagens amplamente variáveis nas diferentes células do SNC e nos tecidos periféricos. A MAO-A catalisa preferencialmente a desaminação da NA e da 5-HT e é selectivamente inibida pela clorgilina, enquanto que a MAO-B actua no amplo espectro das feniletilaminas (incluindo a β -feniletilaminas) e é selectivamente inibida pelo deprenil (10). A inibição destas enzimas é usada em termos farmacológicos pois induz o aumento da concentração de NA, de DA e de 5-HT, em especial no cérebro (10).

A MAO presente no tracto gastrointestinal e no fígado desempenha um importante papel protector, prevenindo o acesso à circulação das aminas de acção indirecta, como a tiramina e a feniletilamina existentes na alimentação. Desta forma, pacientes tratados com inibidores da MAO (usados no tratamento da depressão ou hipertensão) não apresentam esta protecção, podendo manifestar crises hipertensivas após ingestão de alimentos com elevadas quantidades de tiramina, como o queijo, vinho do Porto e arenque. A desaminação pela MAO pode ser prevenida pela presença de um grupo metilo substituinte na posição α

da cadeia lateral da feniletilamina justificando-se, deste modo, a prolongada duração de acção da anfetamina e estimulantes relacionados (10).

A COMT, sendo encontrada em praticamente todas as células (incluindo eritrócitos (36), pode actuar ao nível das catecolaminas extraneuronais. Esta enzima requer Mg^{2+} e catalisa a transferência de um grupo metilo do co-substrato S-adenosilmetionina para o grupo 3-hidroxilo do anel catecol. Desta forma, a COMT, particularmente no fígado, desempenha um importante papel no metabolismo de catecolaminas endógenas circulantes e de catecolaminas administradas. A COMT tem uma vasta especificidade de substrato, metilando virtualmente qualquer catecol, independentemente dos constituintes da cadeia lateral, e, por este facto, não foi ainda possível desenvolver inibidores competitivos da enzima com significado farmacológico (10). Por outro lado, a inibição da COMT não parece produzir efeitos farmacológicos marcados (5).

Na [Figura 1.2](#) estão descritas as diferentes vias metabólicas para a ADR e a NA. Estas são inicialmente desaminadas oxidativamente pela MAO a 3,4-diidroxifenilglicoaldeído (DOPGAL). Este aldeído é posteriormente reduzido a 3,4-diidroxifeniletilenoglicol (DOPEG) por acção da aldeído redutase ou sofre oxidação catalisada pela aldeído oxidase/desidrogenase, com a formação do ácido 3,4-diidroximandélico (DOMA). A ADR e a NA que entram na circulação (a partir da medula adrenal, após administração ou por libertação das fibras adrenérgicas por exocitose) são extensamente metiladas pela COMT a metanefrina ou normetanefrina, respectivamente. A normetanefrina e a metanefrina podem posteriormente sofrer oxidação, catalisada pela MAO, originando o 3-metoxi-4-hidroxifenilglicoaldeído (MOPGAL). O MOPGAL pode, por sua vez, ser reduzido a 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenoglicol (MOPEG) por acção da aldeído redutase ou ser oxidado, pela aldeído oxidase, a ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (ácido vanililmandélico, VMA). Estes dois últimos compostos podem, igualmente, formar-se pela acção da COMT sobre o DOPEG e DOMA, respectivamente. Por acção de uma álcool oxidase, o metabolito MOPEG livre é extensamente convertido em VMA, constituindo-se este como o principal metabolito das catecolaminas excretado na urina. O produto da degradação metabólica da DA correspondente ao VMA é o ácido homovanílico (HVA). As

catecolaminas e os correspondentes glicóis e, em alguma extensão, as aminas O-metiladas podem sofrer conjugação, com a consequente formação dos respectivos sulfatos e glucuronídeos (5).

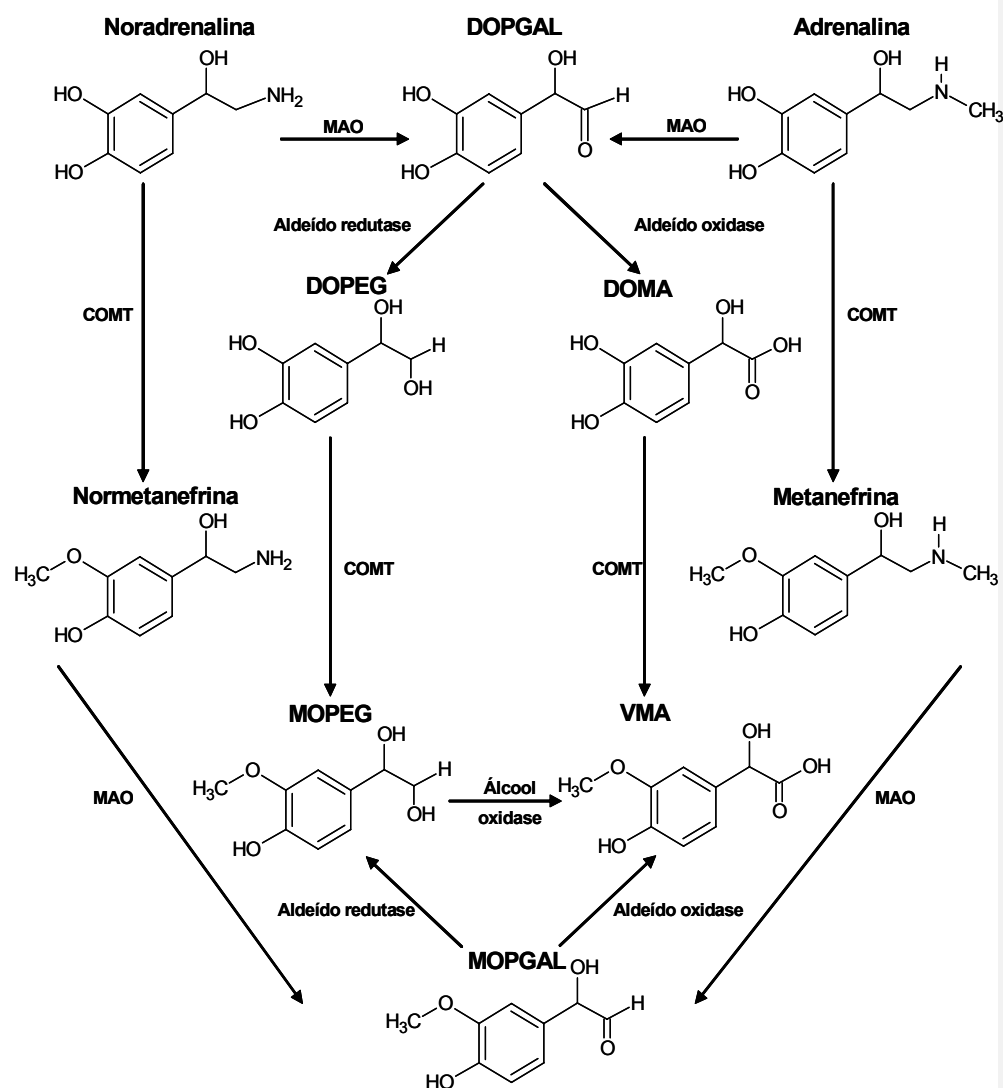
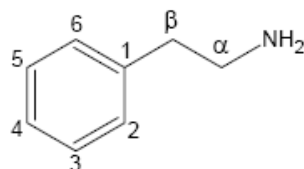


Figura 1.2 - Metabolismo das catecolaminas [adaptado de (5)].

1.1.3 Aminas Simpaticomiméticas

Sob a designação de aminas simpaticomiméticas podem-se referir o conjunto de aminas, de origem natural ou sintética, que apresentam uma actividade simpática (5). Caracterizam-se como compostos com actividade farmacológica e cuja acção pode ser modulada por alterações ao nível da estrutura base, a β -feniletilamina (2). Este composto define-se, então, como o composto base das aminas simpaticomiméticas, consistindo num anel benzénico e uma cadeia lateral etilamina ([Figura 1.3](#)~~Figura 1.3~~). A sua estrutura permite que sejam feitas substituições no anel aromático, nos carbonos α e β e no grupo amino terminal, originando uma grande diversidade de compostos com actividade simpaticomimética. Estas substituições permitem, ainda, variar a intensidade e a especificidade dos efeitos adrenérgicos destes compostos. A NA, ADR, DA, ISO e alguns outros compostos, têm grupos hidroxilo substituídos nas posições 3 e 4 do anel benzénico. Uma vez que o *o*-dihidroxibenzeno é também conhecido como catecol, as aminas simpaticomiméticas com estas substituições no anel aromático são designadas catecolaminas (2).

Na [Figura 1.3](#)~~Figura 1.3~~ são apresentadas as estruturas de várias aminas simpaticomiméticas. Muitos compostos que podem actuar directamente como simpaticomiméticos influenciam ambos os receptores α e β , mas as suas actividades variam desde a predominantemente α (fenilefrina) à predominantemente β (ISO) (2).

**β-FENILETILAMINA**

	2	3	4	5	β	α	N
Adrenalina	H	OH	OH	H	OH	H	CH ₃
Noradrenalina	H	OH	OH	H	OH	H	H
Dopamina	H	OH	OH	H	H	H	H
Isoprenalina	H	OH	OH	H	OH	H	CH(CH ₃) ₂
Metaproterenol	H	OH	H	OH	OH	H	CH(CH ₃) ₂
Terbutalina	H	OH	H	OH	OH	H	C(CH ₃) ₃
Fenilefrina	H	OH	H	H	OH	H	CH ₃
Metoxamina	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH	CH ₃	H
Albuterol	H	CH ₂ OH	OH	H	OH	H	C(CH ₃) ₃
Anfetamina	H	H	H	H	H	CH ₃	H
Efedrina	H	H	H	H	OH	CH ₃	CH ₃
Tiramina	H	H	OH	H	H	H	H

Formatted Table

Figura 1.3 - Estruturas químicas de aminas simpaticomiméticas [adaptado de (5)].

Durante muitos anos pensou-se que as aminas simpaticomiméticas provocavam os seus efeitos unicamente actuando directamente nos receptores adrenérgicos. Esta noção foi, contudo, abandonada com a descoberta de que os efeitos da tiramina e de outros compostos não pertencentes ao grupo das catecolaminas eram diminuídos ou abolidos após desnervação pós-ganglionar crónica ou tratamento com cocaína ou reserpina. Adicionalmente, nestas circunstâncias, os efeitos decorrentes da administração exógena de ADR e, especialmente, NA, eram muitas vezes potenciados. Estas observações levantaram a hipótese de a tiramina e aminas relacionadas actuarem

indirectamente após a sua recaptação ao nível das terminações nervosas adrenérgicas. Deste modo, uma vez recaptadas provocavam a deslocação da NA dos seus locais de armazenamento nas vesículas e dos seus locais extravesiculares. A NA poderia, de seguida, abandonar a terminação nervosa adrenérgica, interagir com os receptores adrenérgicos e, conseqüentemente, exercer efeitos simpaticomiméticos ao nível das células efectoras (2).

O mecanismo pelo qual estas aminas de acção indirecta provocam a libertação de NA pelos terminais nervosos é extremamente complexo. Sabe-se, tal como já anteriormente referido, que todos estes agentes são substratos do sistema de captação 1 (com excepção da ISO). Como consequência do seu transporte pela membrana neuronal, estes compostos são libertados no axoplasma tornando disponível o transportador (presente na superfície interna da membrana) para efectuar o transporte da NA para fora da célula (processo de difusão por permuta facilitada). Além deste efeito, estas aminas são igualmente capazes de mobilizar a NA armazenada nas vesículas competindo pelo processo de captação vesicular. Desta forma, a diminuição das reservas de catecolaminas (após tratamento com reserpina ou por degeneração das terminações nervosas adrenérgicas) tem como consequência a ausência de efeito destes compostos de acção indirecta (2).

1.2. A Toxicidade das Catecolaminas

1.2.1 Stress Oxidativo na Toxicidade das Catecolaminas

O stress oxidativo é um mecanismo com um papel central em diversas patologias, tais como a reperfusão pós-isquémica, aterosclerose, cancro e outras doenças crónicas, assim como parece desempenhar um papel importante no processo de envelhecimento (37). O stress oxidativo desencadeia-se quando há uma alteração da relação pró-oxidante/antioxidante em favor da acção pró-oxidante (38). Ou seja, este processo envolve qualquer condição na qual espécies pró-oxidantes podem exercer os seus efeitos tóxicos devido a uma produção aumentada destes ou a uma diminuição dos mecanismos celulares de protecção.

Na acção pró-oxidante participam espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS), as quais compreendem radicais e formas moleculares de oxigénio ou azoto. Os radicais podem ser definidos como espécies capazes de existência independente que contêm um ou mais electrões desemparelhados [ex.: radical hidroxilo (HO^\bullet) e dióxido de azoto ($^\bullet\text{NO}_2$)] (37). O electrão desemparelhado é todo o electrão que se encontra isolado numa orbital. As formas moleculares de oxigénio e de azoto são moléculas que possuem, em determinadas condições, a capacidade de originar radicais [exemplo, peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e peroxinitrito (ONOO^\bullet)]. O O_2 apresenta-se na forma dirradicalar, ou seja, com dois electrões desemparelhados, podendo, por isso, ser representado por $\text{O}_2^{2\bullet}$ (39) ou $\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$ (40). Apesar da sua natureza dirradicalar, as restrições de natureza mecânico-quântica não permitem grande reactividade ao O_2 (41). Físico-quimicamente, o O_2 pode reagir por activação fotodinâmica com produção do oxigénio no estado de singleto ($^1\text{O}_2$ ou $\text{O}=\text{O}^\bullet$) ou, então, por redução sequencial de um electrão até quatro electrões (Figura 1.4).

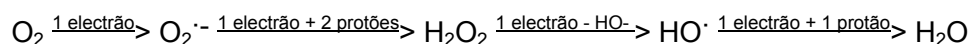


Figura 1.4 - Formação de $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e HO^\bullet a partir da redução univalente sequencial de quatro electrões do oxigénio molecular.

Neste processo pode observar-se a formação do anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 e do HO^{\cdot} pela redução univalente sequencial de quatro electrões do O_2 até H_2O (37). De referir que o radical $O_2^{\cdot-}$ pode sofrer dismutação, quer espontânea quer catalisada pela superóxido-dismutase (SOD), para formar o H_2O_2 . De entre os elementos mencionados a espécie oxidante mais reactiva é o HO^{\cdot} . O radical HO^{\cdot} é considerado o radical livre mais tóxico para as células, levando à oxidação de componentes celulares, incluindo proteínas, DNA e lípidos. Por outro lado, o radical $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com o monóxido de azoto (NO) levando à formação de RNS, nomeadamente o anião peroxinitrito com elevado potencial tóxico (42). Dada a reactividade do HO^{\cdot} , este reage com a molécula mais próxima do seu local de formação possuindo, por isso, uma capacidade de difusão muito limitada. A formação deste radical ocorre facilmente no organismo na presença de H_2O_2 e de metais de transição, tais como o ferro e cobre ([Figura 1.5](#)) (37, 43, 44):

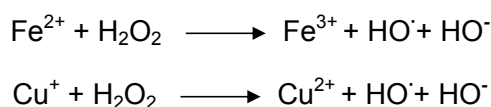


Figura 1.5 - Formação do radical HO^{\cdot} na presença de Fe^{2+} e Cu^{+} Reacção de Fenton.

Estas reacções denominadas de reacção de Fenton estão muito associadas aos fenómenos resultantes do stress oxidativo, tais como a peroxidação lipídica, oxidação dos grupos sulfidrilo proteicos, lesões no DNA, alterações intracelulares do Ca^{2+} , desacoplamento mitocondrial, e até a apoptose e necrose (37). É, por isso, uma reacção recorrente na explicação dos fenómenos tóxicos envolvendo o stress oxidativo, como será observado ao longo desta dissertação.

No caso particular das catecolaminas, tal como será descrito nos capítulos seguintes, o stress oxidativo resultante do seu metabolismo oxidativo é um dos mecanismos de cardiotoxicidade propostos para estes compostos. O metabolismo destes compostos pode ocorrer por duas vias, via metabolização pela MAO e/ou via formação de quinonas e aminocromos, realçando que as formas quinónicas

das catecolaminas podem sofrer conjugação com a glutatona regenerando o anel catecol. Além disso, mesmo sofrendo conjugação com a glutatona, estes compostos podem continuar a oxidar-se, o que poderá explicar o stress oxidativo por eles provocado.

1.2.1.1. Metabolização oxidativa pela MAO

A MAO é responsável por uma das vias metabólicas das catecolaminas, catalisando a desaminação oxidativa destes compostos ([Figura 1.2](#)~~Figura 1.2~~). Existem indícios de que a cardiotoxicidade das catecolaminas pode, em parte, resultar da actividade desta enzima. De facto, ocorre a formação de H_2O_2 durante a metabolização das catecolaminas pela MAO. A reacção catalisada pela MAO está ilustrada na [Figura 1.6](#)~~Figura 1.6~~ para o caso específico da adrenalina.

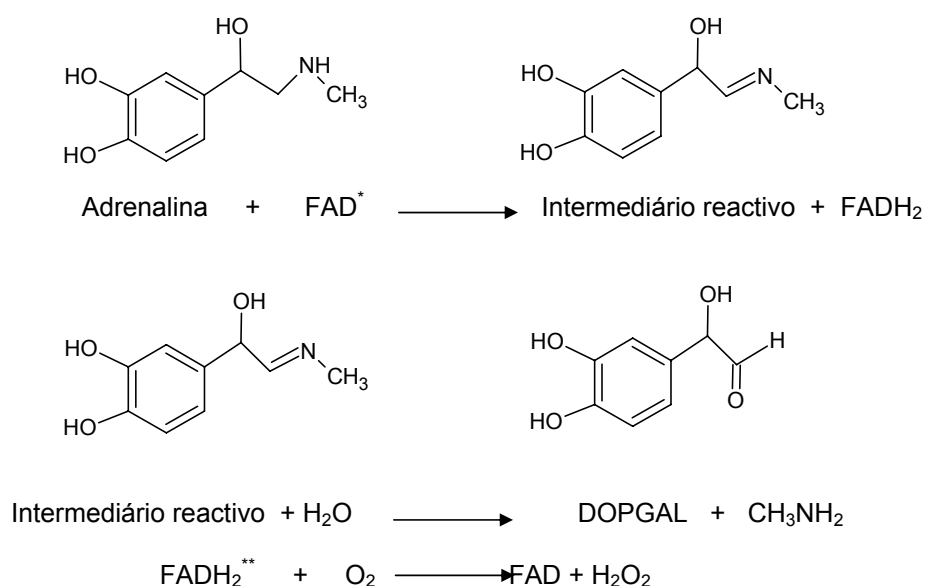


Figura 1.6 - Formação de H_2O_2 durante a reacção metabólica catalisada pela MAO [adaptado de (45)]. * FAD - Dinucleótido de adenina flavina; ** $FADH_2$ - Forma reduzida do dinucleótido de adenina flavina

Deste modo, na reacção acima ilustrada, ocorre a oxidação do substrato pela enzima, a qual é, também, reduzida ($\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}_2$). Posteriormente, o oxigénio é incorporado no substrato, sendo que este oxigénio deriva de uma molécula de água e não do oxigénio molecular. O ciclo catalítico termina com a reoxidação da enzima reduzida ($\text{FADH}_2 \rightarrow \text{FAD}$) pelo oxigénio, processo em que ocorre a geração de peróxido de hidrogénio (45).

Em conformidade, foi observada, em estudos *in vivo*, toxicidade resultante do metabolismo das catecolaminas, que parece ser, em parte, devida à formação de H_2O_2 pela actividade da MAO (46-48). Adicionalmente, nestes estudos, a toxicidade foi reduzida mediante o pré-tratamento com inibidores da MAO. Deste modo, o stress oxidativo resultante do H_2O_2 acumulado e da consequente reacção de Fenton ([Figura 1.5](#)~~Figura 1.5~~) poderá ser responsável pela toxicidade observada para este tipo de compostos.

1.2.1.2. Oxidação das Catecolaminas a Quinonas e Aminocromos

Além das vias metabólicas descritas (MAO e COMT), as catecolaminas poderão, em determinadas situações patológicas, sofrer oxidação a quinonas e aminocromos. A grande capacidade que estes compostos apresentam para originar ciclos redox, induzir stress oxidativo e formar aductos com macromoléculas pode resultar na destruição de moléculas essenciais à sobrevivência celular (46, 49-53). A abordagem deste processo de oxidação das catecolaminas é essencial nesta dissertação, uma vez que dele decorre a formação de aductos com a glutatona. Desta forma, os pontos seguintes serão abordados com maior pormenor.

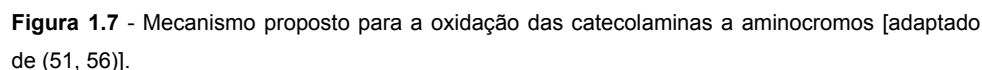
1.2.1.2.1 Via Oxidativa das Catecolaminas

O normal catabolismo das catecolaminas procede, como já referido, através de duas vias enzimáticas principais envolvendo a enzima mitocondrial MAO e a

COMT (~~Figura 1.2~~Figura 1.2) (2, 54). Contudo, em situações patológicas, as catecolaminas podem sofrer um fenómeno de auto-oxidação com formação de ROS, como H_2O_2 , radicais superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) e HO^{\cdot} , e de diversos intermediários reactivos, como é o caso das quinonas e semi-quinonas (~~Figura 1.7~~Figura 1.7) (50, 51). O processo básico de oxidação das catecolaminas foi proposto há muitos anos atrás por Raper (1928) com o objectivo de explicar o mecanismo de formação da melanina (55). Numa primeira fase, as catecolaminas são oxidadas a *o*-semiquinonas as quais, por exemplo, por dismutação, dão rapidamente origem às correspondentes *o*-quinonas. As catecolaminas-*o*-quinonas são extremamente instáveis e, após desprotonação do grupo amina, pode ocorrer um ataque nucleofílico do átomo de azoto à posição 6 do anel quinónico, resultando na ciclização 1,4-intramolecular irreversível da molécula. Forma-se, deste modo, um intermediário instável designado por leucoaminocromo, o qual pode ser oxidado a *o*-semiquinona e esta, por sua vez, a aminocromo (50, 51).

Contudo, a velocidade com que ocorre a ciclização das catecolaminas está inteiramente dependente dos seus grupos substituintes (56-58). Desta forma, a presença de grupos dadores de electrões (como é o caso dos grupos metilo), nos carbonos α e β e, sobretudo, no átomo de azoto, facilita a ciclização (58). No caso da ADR, o processo de ciclização intramolecular predomina dando, consequentemente, origem ao aminocromo, enquanto que no caso da NA a ciclização é mais lenta, tornando mais provável o ataque da forma quinónica a locais nucleofílicos intracelulares (57). Por outro lado a DA é, das três catecolaminas, a que apresenta menor tendência para sofrer ciclização da respectiva forma quinónica, tornando predominante a ligação covalente aos locais intracelulares, nomeadamente os grupos SH, OH e NH_2 . Surge, deste modo, a seguinte ordem crescente de velocidade de ciclização: DA, NA, ISO e ADR (57). Fazendo uma comparação das respectivas velocidades de ciclização foi descrito que a ADR cicliza 6 vezes mais rápido do que a ISO e 140 vezes mais rápido do que a NA (58).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold



Durante o processo de oxidação das catecolaminas, há cedências de electrões que podem ter o O_2 como aceitador de electrões com formação do radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$). Este processo poderá dar origem a um fenómeno de stress oxidativo, tal como já descrito no ponto 1.2.1. Deste modo, uma característica relevante do processo de oxidação das catecolaminas é a possibilidade dos produtos de oxidação (como quinonas e aminocromos) poderem entrar em ciclos redox levando à formação de ROS e RNS (50). Estas espécies reactivas, além de potencialmente tóxicas via stress oxidativo, podem, elas próprias, catalisar a oxidação das catecolaminas (50). Deste modo, a capacidade dos radicais oxidarem as catecolaminas é extremamente importante, pois todos os processos que levem à sua formação podem induzir este processo de oxidação.

O referido processo de oxidação das catecolaminas com formação de quinonas e aminocromos advém do anel catecol presente nestas moléculas (50). Por conseguinte, o catecol é susceptível de sofrer oxidação e, dos vários agentes oxidantes existentes nos organismos vivos, o oxigénio constitui-se, provavelmente, como o mais importante, sendo virtualmente ubíquo e estando presente em concentrações relativamente elevadas. As soluções fenólicas sofrem oxidação pelo oxigénio a pH fisiológico, sendo esta oxidação normalmente designada por autooxidação. Esta reacção de autooxidação é favorecida em meio alcalino sendo, no entanto, extremamente lenta a pH fisiológico e, por isso, constitui uma fonte pouco significativa de radicais livres de oxigénio em termos biológicos (44, 59). Contudo, este processo de oxidação pode, em condições fisiológicas e patológicas, ser catalisado por enzimas, como a xantina oxidase (60), lipoxigenase (61), tirosinase (62), várias catecol-oxidases contendo cobre (50), pela mieloperoxidase dos leucócitos (63, 64), pela citocromo-c-oxidase presente no músculo esquelético (46), pelo complexo I mitocondrial (65) ou na presença de metais como cobre, manganésio, ferro, cobalto, níquel e de vários quelatos de cobre e ferro, como por exemplo, a ferrilmioglobina (66), a S-nitrosoglutationa/ Cu^{2+} (67), a ceruloplasmina (α_2 -glicoproteína plasmática que armazena o cobre) (68), o ferricianeto e o ferricitocromo c (50). Por exemplo, na presença de Cu^{2+} a taxa de oxidação da adrenalina é directamente proporcional à concentração de cobre, o qual parece formar um complexo Cu^{2+} -adrenalina (50). Particularmente relevante do ponto de vista biológico é a oxidação das catecolaminas pelos iões de ferro e pelos seus complexos, apesar de muitos destes mecanismos de reacção não estarem conclusivamente elucidados. O ferro forma, deste modo, um complexo violeta por interacção com o grupo catecol da molécula, o que parece causar a oxidação das catecolaminas (50). Por outro lado, o reagente de Fenton (uma mistura de peróxido de hidrogénio e iões ferroso) catalisa a oxidação da ADR a adrenocromo e, a ferritina, na presença de peróxido de hidrogénio age da mesma forma, sugerindo que o radical hidroxilo (HO^\bullet) está envolvido no processo de oxidação (50). Deste modo, radicais como o HO^\bullet , o $\text{O}_2^{\bullet-}$ (50, 69), e o $^\bullet\text{NO}$ (70) podem, também, induzir o processo de oxidação das catecolaminas em sistemas biológicos.

As catecolaminas podem, igualmente, ser oxidadas por preparações microsossomais e mitocondriais, processo em que está envolvido o anião superóxido, o qual é produzido pelas cadeias de transferência de electrões microsossomais e mitocondriais, na presença de substratos apropriados (ver em Bindoli *et al.*, 1992).

Os aminocromos são substâncias de cor avermelhada que, pela sua instabilidade, podem sofrer diversas alterações, tais como rearranjos, oxidações e reduções (50). Deste modo, por redução, os aminocromos podem dar origem ao 5,6-diidroxiindole (1; ~~Figura 1.8~~~~Figura 1.8~~) [5,6-diidroxi-1-metilindolo (DHMI) se provier do adrenocromo] ou, por rearranjo intramolecular, ao 5,6-diidroxiindoxilo, também denominado aminolutina (2; ~~Figura 1.8~~~~Figura 1.8~~). O primeiro composto deriva de aminocromos sem o substituinte hidroxilo na posição 3, enquanto que o segundo corresponde a um tautómero dos aminocromos com o substituinte hidroxilo na posição 3. Este último rearranjo é catalisado em meio alcalino ou na presença de metais, especialmente Zn^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} , correspondendo a uma reacção redox intramolecular (71). As aminolutinas assim formadas podem reagir com os aminocromos formando dímeros aminocromo-aminolutina (3; ~~Figura 1.8~~~~Figura 1.8~~) ou podem, ainda, sofrer uma oxidação a 5,6-diidroxiindolequinona [5,6-diidroxi-1-metilisatina (DHMI) se provier do adrenocromo] (4; ~~Figura 1.8~~~~Figura 1.8~~), originando posteriormente dímeros de aminolutinas (5; ~~Figura 1.8~~~~Figura 1.8~~) (56, 71, 72).

Estes compostos podem, por sua vez, dar origem a pigmentos escuros insolúveis, de composição ainda não totalmente esclarecida, denominados por melaninas (56, 73, 74). A via melhor caracterizada que descreve a formação da melanina é o mecanismo de Raper-Manson, de acordo com o qual a formação de melaninas ocorre através do rearranjo do aminocromo a 5,6-diidroxiindole o qual, após oxidação à quinona correspondente, sofre uma série complexa de reacções de auto-condensação. Apesar da aparente simplicidade deste processo, este parece ser mais complicado *in vivo*, onde estão presentes outros factores, como iões metálicos ou compostos sulfidrílo, os quais afectam a química do processo de formação de melaninas. Além de encontradas na pele, cabelo, coróide e íris do olho e no ouvido interno, as melaninas são também encontradas no cérebro onde

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

são designadas por neuromelaninas. Estes compostos são originários da DA (*substância nigra*) e NA (*locus ceruleus*) e o seu papel não foi ainda claramente definido, parecendo actuar como produtos de acumulação de resíduos (*waste accumulation products*) ou “scavengers” de radicais livres. Os produtos de oxidação das catecolaminas, tais como as melaninas, podem, também, induzir a oxidação das catecolaminas (74).

Além das reacções acima citadas, os aminocromos podem, adicionalmente, sofrer reduções, originando novamente os incolores leucoaminocromos (6; ~~Figura 1.8~~~~Figura 1.8~~) (50, 62). Estas reacções de redução ocorrem na presença de antioxidantes, tais como ácido ascórbico, glutatona ou cisteína e levam à formação de um intermediário semi-quinónico altamente reactivo. Este intermediário pode também ser formado enzimaticamente por acção da NADPH-citocromo-b₅-redutase, da NADPH-citocromo-P450-redutase ou da cadeia respiratória na presença de NADH (75, 76). Enzimas presentes na superfície externa das membranas, de que são exemplo algumas flavoenzimas e a ferricianeto-redutase, apresentam também a capacidade de reduzir, com um electrão, as quinonas e aminocromos (66, 77).

A redução dos aminocromos a leucoaminocromos pode, adicionalmente, ser catalisada pela flavoproteína DT-diaforase (presente no fígado e no cérebro), num processo que envolve a transferência simultânea de 2 electrões do NAD(P)H, evitando, deste modo, a formação de semiquinonas (76, 78, 79). Apresentando um substituinte hidroxilo na posição 3 os leucoaminocromos podem, espontaneamente, sofrer uma desidratação a 5,6-diidroxiindole (1; ~~Figura 1.8~~~~Figura 1.8~~), o qual sofre posterior redução à nova forma de leucoaminocromo (6; ~~Figura 1.8~~~~Figura 1.8~~) (50).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

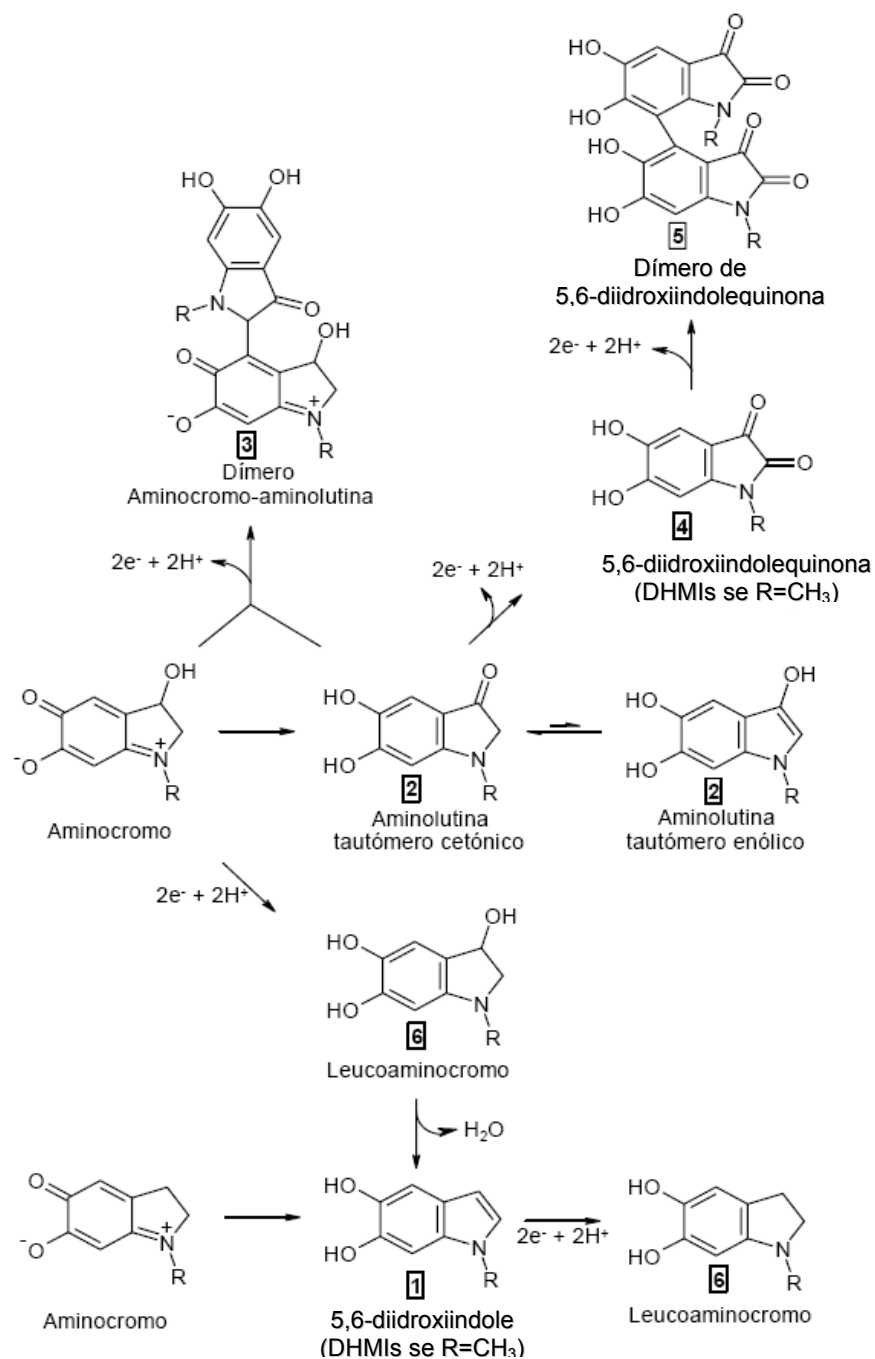


Figura 1.8 - Mecanismos propostos para a reactividade dos aminocromos [adaptado de (50, 56, 80, 81)].

1.2.1.2.2 Formação de Aductos com a Glutathione

As o-quinonas, semi-quinonas e os aminocromos são compostos electrofílicos altamente reactivos podendo, por este facto, interagir com nucleófilos, como os grupos amina e sulfidril, presentes por exemplo nas proteínas e formar aductos relativamente estáveis (56, 82, 83). Os nucleófilos mais susceptíveis pertencem ao grupo dos tióis, onde se encontram a glutathione e a cisteína (esta última muitas vezes presente em proteínas) originando, deste modo, aductos que expressam com frequência toxicidade (56, 73, 82, 84, 85). No entanto, a reacção com a glutathione é normalmente considerada citoprotectora, uma vez o seu grupo tiol serve como nucleófilo “de sacrifício”, protegendo locais nucleofílicos críticos em macromoléculas celulares de modificação irreversível.

A glutathione é um antioxidante hidrossolúvel reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos (86), sendo sintetizada no organismo como um tripéptido linear constituído por três aminoácidos (glicina, ácido glutâmico e cisteína) (86, 87). De salientar que o local activo responsável pelas propriedades bioquímicas da molécula corresponde ao grupo tiol do aminoácido cisteína. Na maioria das células existe em concentrações compreendidas entre 1 e 8 mM (87), sendo a sua concentração no coração e no fígado cerca de 2 e 8 mM, respectivamente (37). Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou dimerizada (GSSG, forma oxidada da GSH). Este par é de extrema importância uma vez que a razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos (88). Em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fracção da glutathione total (menos de 10%) (37). Adicionalmente, a GSH pode, também, formar dissulfuretos do tipo GSSR com o tiol da cisteína presente em proteínas (86). A síntese da GSH ocorre em dois passos, catalisados pela γ -glutamyl-cisteína-sintetase e pela glutathione-sintetase (86, 87), sendo que este processo de síntese ocorre a nível hepático. Após a síntese, a GSH é distribuída a todos os tecidos através da circulação sanguínea (86, 89). A degradação da GSH e GSSG nos seus aminoácidos constituintes ocorre ao nível extracelular, essencialmente ao nível renal numa reacção

catalisada pela γ -glutamyltranspeptidase e pela cisteinil-glicina-dipeptidase (86, 87).

A importância da glutatona deriva do facto de estar omnipresente na célula, onde desempenha um papel crucial na metabolização do H_2O_2 e outros hidroperóxidos, na metabolização de xenobióticos e na desactivação de radicais. A glutatona está, igualmente, envolvida no metabolismo do ácido ascórbico, na manutenção da comunicação entre as células, na prevenção da oxidação dos grupos SH presentes nas proteínas e no transporte do cobre intracelular (37). Deste modo, a diminuição dos níveis de GSH (por exemplo, como consequência da formação de aductos das catecolaminas com a GSH) pode comprometer as defesas celulares, aumentando a susceptibilidade das células para os danos oxidativos decorrentes do metabolismo oxidativo das catecolaminas.

A formação dos aductos entre os produtos resultantes da oxidação das catecolaminas e a GSH pode ocorrer por substituição ou por adição (**Figura 1.9**) (50). A reacção de adição é reversível, o que torna possível que os tióis actuem como transportadores, por exemplo, dos aminocromos. Pelo contrário, a reacção de substituição é irreversível e parece estar envolvida na formação da melanina (50).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

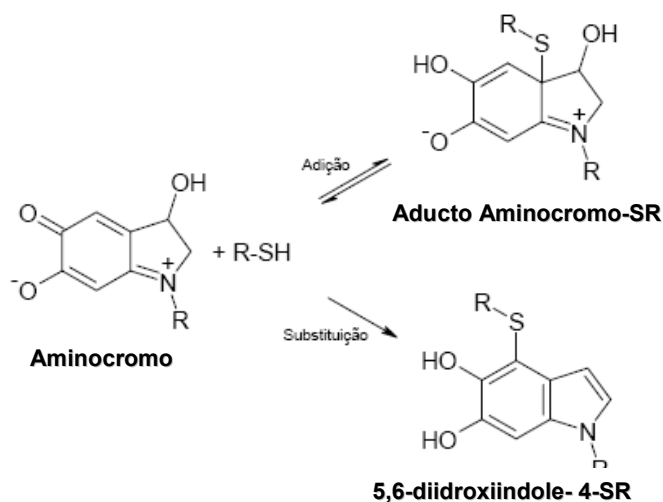


Figura 1.9 - Reacção de substituição e de adição entre aminocromos e tióis [adaptado de (50)].

No âmbito do presente trabalho experimental, os aductos alvo de estudo formam-se por conjugação das catecolaminas-o-quinonas (após a oxidação das catecolaminas correspondentes) com a GSH. Resumidamente, o mecanismo de formação do aducto envolve um catecol que, após oxidação a quinona, reage rapidamente com grupos tióis (84). A grande capacidade que as quinonas apresentam para originar ciclos redox, induzir stress oxidativo e formar aductos com macromoléculas biológicas (como por exemplo, proteínas e ácidos nucleicos) pode resultar na destruição de macromoléculas biológicas. Desta forma, a reacção da GSH com as quinonas corresponde muito provavelmente a um mecanismo de defesa (90). Após conjugação da quinona com a GSH ocorre a regeneração do anel catecol ([Figura 1.10](#)~~Figura 1.10~~) (84). Os conjugados polifenóis-GSH e os seus metabolitos mantêm as propriedades electrofílicas e redox dos polifenóis iniciais e, de facto, a reactividade dos metabolitos tioéter excede frequentemente a do composto pai (84, 90, 91). Desta forma, os tioéteres formados pela adição de grupos SH poderão ser intervenientes importantes nos efeitos tóxicos resultantes. De realçar que estes tioéteres podem, ainda, sofrer oxidação a quinonas-tioéter que, sendo compostos extremamente reactivos, podem reagir com uma nova molécula de GSH formando biconjugados (91) ([Figura 1.10](#)~~Figura 1.10~~).

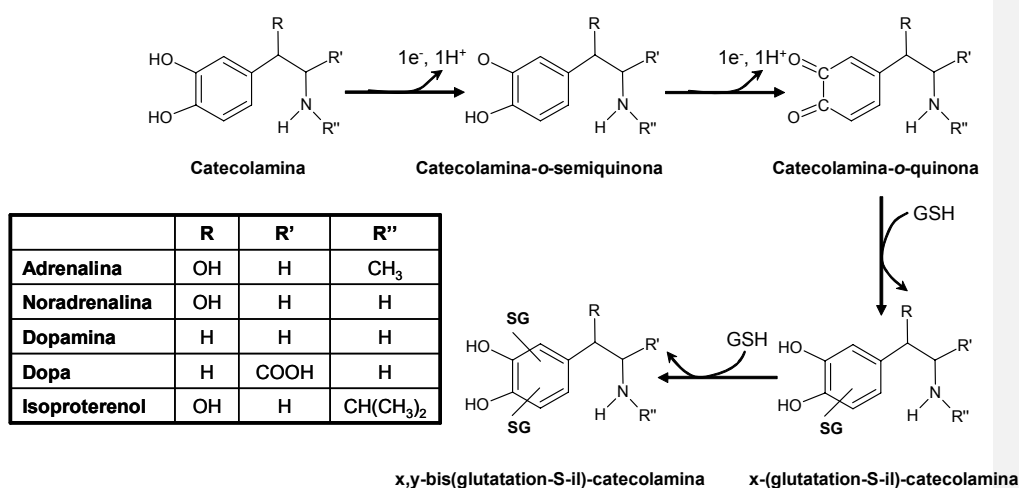


Figura 1.10 - Mecanismo proposto para a formação de aductos das catecolaminas com a glutathione [adaptado de (162, 165, 191)].

Apesar do transporte activo dos conjugados polifenol-GSH para fora da célula onde são formados limitar a sua potencial toxicidade nessas células, estes compostos, uma vez na circulação, podem ser transportados para tecidos capazes de os acumular (91). A localização frequente da γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) em células que separam a circulação de um segundo compartimento de fluido coincide com tecidos que são susceptíveis quer à toxicidade induzida pelo conjugado polifenol-GSH, quer à toxicidade induzida por quinonas e espécies reactivas de oxigénio (91). Em consonância, tem sido descrita a capacidade de os conjugados entre a GSH e diversos polifenóis induzirem nefrotoxicidade, nefrocarcinogenicidade e neurotoxicidade (90, 91).

As quinonas, além dos grupos tióis, podem reagir com grupos amina formando bases de Schiff (Figura 1.11Figura 1.14). Embora as aminas sejam nucleófilos mais fracos que os tióis, a sua alta concentração ao nível biológico pode tornar este processo significativo (73). Estas reacções levam à formação de aductos entre as quinonas e as proteínas que, no entanto, não impede a continuação do processo oxidativo destas quinonas ligadas, como, por exemplo, a ciclização da catecolamina-o-quinona a aminocromo (73).

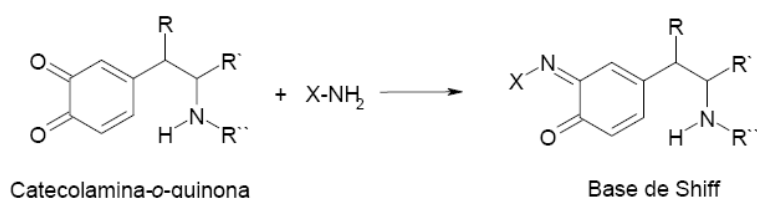


Figura 1.11- Formação de bases de Schiff a partir das catecolaminas-o-quinonas [adaptado de (73)].

Seguidamente, será abordada a toxicidade das catecolaminas em vários sistemas do organismo, assim como a toxicidade dos produtos resultantes do seu metabolismo, nomeadamente os correspondentes aductos com a GSH. Contudo, no que diz respeito, especificamente, aos aductos das catecolaminas biogénicas

com a GSH, os estudos até ao momento efectuados estão, apenas, relacionados com a toxicidade neuronal dos aductos da dopamina. Desta forma, serão abordados outros tipos de toxicidade usando como exemplo compostos estruturalmente semelhantes, como os derivados catecóis da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA). Alerta-se, deste modo, para o que ainda é necessário investigar no que diz respeito aos aductos das catecolaminas biogénicas, nomeadamente a nível cardíaco, e para a importância toxicológica da determinação destes compostos a nível biológico.

1.2.2 Cardiotoxicidade

Um estímulo de stress provoca a libertação de catecolaminas através do sistema nervoso autónomo e da medula adrenal (designada por resposta *fight or flight*) (49). A acção inicial destes compostos é benéfica a nível do sistema cardiovascular e da necessidade global de energia do organismo (92). Contudo, uma prolongada elevação dos níveis de catecolaminas na circulação sanguínea pode iniciar efeitos deletérios, sobretudo a nível cardíaco (49).

São vários os mecanismos propostos para a cardiotoxicidade das catecolaminas, tais como hipóxia, insuficiência coronária e alterações hemodinâmicas e metabólicas (93). Adicionalmente, o stress oxidativo resultante da formação de radicais durante a oxidação das catecolaminas e dos próprios produtos desse processo oxidativo (por exemplo, quinonas e aminocromos) pode, também, desempenhar um importante papel na toxicidade destes compostos (46). Serão, de seguida, resumidamente abordados os principais mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade exercida pelas catecolaminas.

As catecolaminas aumentam, como anteriormente referido, o ritmo cardíaco, sendo este efeito mediado pela activação dos receptores β -adrenérgicos. Este aumento do ritmo cardíaco provoca um aumento drástico da necessidade miocárdica de oxigénio podendo, por conseguinte, induzir uma situação de hipóxia. Esta situação de hipóxia pode, ainda, ser agravada pela redução do

fornecimento de oxigénio como consequência da vasoconstrição coronária induzida por estes compostos (46).

Um outro mecanismo proposto para a cardiotoxicidade das catecolaminas diz respeito à situação de isquémia parcial que surge como resultado dos espasmos coronários provocados por estes compostos. Esses espasmos parecem induzir a oclusão dos vasos sanguíneos e a diminuição da drenagem venosa.

As catecolaminas podem provocar cardiotoxicidade por um outro mecanismo que envolve alterações ao nível do consumo de oxigénio, produção energética e metabolismo lipídico. Após a administração de catecolaminas ocorre um aumento do consumo de oxigénio que, só em parte, é devido ao aumento da sua utilização como consequência das alterações hemodinâmicas e da função cardíaca. Desta forma, o oxigénio restante, que é também consumido, assume a designação de “desperdício de oxigénio” (“oxygen-wasting”), tendo sido sugerido que resulta, em parte, do fenómeno de oxidação das catecolaminas (46). Uma outra hipótese descrita recentemente para explicar a menor rentabilização do oxigénio implica especificamente a activação dos receptores β_2 . A activação desses receptores pela isoprenalina resulta na preferência pela oxidação dos ácidos gordos livres em detrimento da glicólise (94). Como consequência, ocorre a manutenção da taxa de consumo de O_2 , apesar do menor rendimento cardíaco (94).

Outro fenómeno que parece estar envolvido na cardiotoxicidade provocada pelas catecolaminas diz respeito ao desacoplamento mitocondrial. Verificou-se que existe uma boa correlação entre o aumento do conteúdo de catecolaminas ao nível do miocárdio e a diminuição da razão P/O mitocondrial [razão entre o difosfato de adenosina (ADP) adicionado à mitocôndria e o oxigénio consumido, que é indicativa da quantidade de O_2 consumida na produção de ATP pela mitocôndria] (46). A alteração da razão P/O foi, deste modo, atribuída à formação de aminocromos e outros metabolitos oxidativos. Desta forma, o desacoplamento mitocondrial parece explicar o referido “desperdício de oxigénio” e a depleção das reservas energéticas do miocárdio que se observa por acção das catecolaminas (49).

Um outro fenómeno que pode ser induzido pelas catecolaminas é a lipólise, fenómeno que é mediado pelos receptores β -adrenérgicos, nomeadamente β_1 e β_2 presentes no tecido adiposo branco e β_3 presentes no tecido adiposo castanho (95). O desacoplamento mitocondrial pode, em parte, dever-se a alterações lipídicas provocadas pela acção das catecolaminas, apesar do aumento de ácidos gordos livres não parecer constituir-se como a primeira causa deste efeito (46). No entanto, as alterações ao nível do metabolismo lipídico podem influenciar a composição das membranas celulares (devido ao aumento do seu conteúdo em ácido araquidónico) afectando, deste modo, a actividade das proteínas membranares (96). Além disso, convém referir que a peroxidação dos lípidos libertados pode, igualmente, contribuir para o fenómeno de necrose associado a estes compostos (97).

A alteração do conteúdo de electrólitos, sobretudo K^+ e Mg^{2+} , ao nível do miocárdio, e a transferência de cationes nas membranas celulares são factores que contribuem para a falência irreversível das funções celulares. Foi já sugerido que, como consequência de situações de deficiência de oxigénio ou de energia, ocorre a perda de K^+ e Mg^{2+} pelo miocárdio, contribuindo para o desenvolvimento de diversas cardiomiopatias. Como consequência da depleção de Mg^{2+} , verifica-se a inibição da acção de diversas enzimas importantes nas reacções de transferência de fosfatos, incluindo enzimas do processo de utilização de ATP. Esta depleção de Mg^{2+} provoca o aumento da captação de Ca^{2+} , podendo este aumento contribuir, igualmente, para o desacoplamento mitocondrial (46).

Envolvido na cardiotoxicidade provocada pelas catecolaminas está outro cation, o Ca^{2+} . Por acção das catecolaminas ao nível dos receptores β ocorre a formação de AMPc, o qual activa os canais de cálcio do tipo L no sarcolema, provocando um aumento drástico da concentração intracelular de Ca^{2+} livre (46, 98). A sobrecarga de Ca^{2+} que se verifica é altamente tóxica para a célula, uma vez que induz a diminuição dos níveis energéticos (por inactivação mitocondrial e por activação excessiva das bombas de Ca^{2+}), a alteração do citoesqueleto (por dissociação dos filamentos de actina ou quebras proteolíticas, levando à formação de vesículas na membrana), a produção de ROS e a activação exacerbada de fosfatases, fosfolipases, proteases e endonucleases (99). O papel relevante do

Ca^{2+} na cardiotoxicidade das catecolaminas é confirmado pelo facto de se poder prevenir essa cardiotoxicidade recorrendo a tratamento capazes de diminuir o influxo de Ca^{2+} nas células como, por exemplo, a administração de verapamil, fármaco que bloqueia os canais de Ca^{2+} (100).

Tal como referido anteriormente, um outro mecanismo proposto diz respeito ao stress oxidativo induzido pelo metabolismo oxidativo das catecolaminas. Este fenómeno pode ocorrer de dois modos, via MAO e/ou via formação de quinonas e aminocromos (ver 1.2.1). Relativamente à segunda via, vários estudos foram descritos para explicar o fenómeno, que se passam a descrever resumidamente.

Em termos gerais, os aminocromos têm características de reactividade muito semelhantes. Deste modo, de acordo com estudos publicados por Beamish *et al.* (1982) foi descrito que a administração de adrenocromo (10 mg.Kg^{-1}) a ratos adultos induz arritmias cardíacas e, para doses superiores a 40 mg.Kg^{-1} , a morte dos animais (101). Por outro lado, outros estudos revelaram que o coração dos animais administrados com adrenocromo (32 mg.Kg^{-1}) apresentava hipercontracção das miofibrilhas, assim como alterações ultraestruturais no miocárdio como, por exemplo, turgescência mitocondrial e edema intracelular (102).

Em estudos *in vitro*, a perfusão do coração de ratos com adrenocromo induziu a necrose do miocárdio (103-106), a qual se caracteriza pela dissolução dos filamentos contrácteis, turgescência da mitocôndria e do retículo sarcoplasmático, ocorrência de bandas de contracção e de edemas intracelulares (104). Foi, ainda, descrito que a perfusão do coração com adrenocromo ($0,1 \text{ mM}$) amplifica os efeitos tóxicos resultantes de um fenómeno isquémico (Rump *et al.*, 2001). Adicionalmente, ao nível cardiovascular, o adrenocromo (16 mg.Kg^{-1}) reduz, *in vivo*, a pressão sanguínea e o ritmo cardíaco (101, 102).

O β -agonista ISO é uma catecolamina sintética usada em toxicologia experimental como composto modelo em estudos de toxicidade das catecolaminas (43, 44, 56, 85). De facto, diversos efeitos tóxicos ao nível do miocárdio foram já reportados como consequência dos níveis circulantes de ISO, entre eles a necrose do miocárdio (56, 85), a qual poderá resultar de alterações na homeostase do Ca^{2+} (85), peroxidação lipídica (56, 85, 98) e diminuição das

reservas de ATP e creatinina fosfato (85). A ISO é oxidada a isoproterenol-o-quinona que cicliza e sofre oxidação formando o aminocromo correspondente, o isoprenocromo. A oxidação da ISO em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato foi já avaliada em três estudos publicados por Remião *et al.* (43, 44, 107). Num desses estudos foi comparada, ao longo da incubação e no meio extracelular, a depleção da ISO por oxidação, nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1 mM na presença ou ausência de Cu^{2+} (20 μM) (43). Num segundo estudo, o processo de oxidação da ISO foi analisado através da avaliação da depleção da ISO e da formação do isoprenocromo, quer ao nível intracelular quer ao nível extracelular, após incubação da suspensão de cardiomiócitos de rato adulto tolerantes ao cálcio com ISO (1 mM), na presença ou ausência de Cu^{2+} (20 μM) (44). A oxidação desta catecolamina sintética foi, igualmente, comprovada num estudo em que se procuraram indícios da oxidação da ISO a isoprenocromo ao nível celular pela detecção, por ressonância paramagnética electrónica (RPE), de radicais intermediários (107). Nesse estudo, descreveu-se a formação das duas formas radicalares da leucoisoprenocromo-o-semiquinona ao nível extracelular e de radicais, possivelmente os mesmos, ao nível dos cardiomiócitos, nas suas membranas, citoesqueleto, núcleos e organelos mais pesados, como as mitocôndrias, lisossomas e peroxissomas (107). No conjunto destes estudos verificou-se uma diminuição da viabilidade celular correlacionada com os produtos resultantes do processo de oxidação da ISO, tais como o isoprenocromo, a leucoisoprenocromo-o-semiquinona ou, ainda, as ROS, em especial o HO^{\cdot} (44). Adicionalmente, verificou-se a diminuição dos níveis de GSH devido a fenómenos de conjugação (44).

Os aminocromos têm sido indicados como uns dos principais responsáveis pela cardiotoxicidade, e em particular da citotoxicidade, das catecolaminas (46). Os aminocromos, e em especial o adrenocromo, estão envolvidos em vários processos tóxicos. Provocam alterações no fluxo de Ca^{2+} , como resultado das suas acções inibitórias ao nível da actividade da bomba de Ca^{2+} sarcoplasmática (98, 108), da actividade do sistema antiporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (98), da actividade da bomba Na^+/K^+ sarcoplasmática (109) e da capacidade de acumulação de Ca^{2+} pela mitocôndria (46, 56, 93, 98). Foi, igualmente, descrito que o adrenocromo inibe a

fosforilação oxidativa mitocondrial, com reflexo no declínio do valor de índice de controlo respiratório (ICR) e na razão ATP/AMP no miocárdio (103). Em conformidade, foi descrita a depressão do ritmo de fosforilação mitocondrial, da razão P/O e dos valores de ICR após a perfusão do coração de rato com ISO oxidada (110). O adrenocromo inibe, também, a fosforilação da glucose e a glicólise, enquanto estimula a síntese de glicogénio e o ciclo das pentoses (46). O adrenocromo pode, igualmente, afectar a actividade muscular pelo facto de inibir a miosina-ATPase (46). As inibições enzimáticas ocorrem também ao nível da MAO e da fosfatase alcalina e várias outras enzimas podem ser afectadas pelo facto de o adrenocromo ter a capacidade de oxidar grupos sulfidrilo ou, ainda, de desaminar aminas e aminoácidos (46). Em conformidade, verificou-se a inibição das enzimas GR, GPX e GST ao nível celular em função da oxidação da ISO (43, 44, 111).

A posterior oxidação e polimerização dos aminocromos leva, tal como anteriormente abordado, à formação de compostos insolúveis de cor escura denominados melaninas, as quais são também referidas como indutoras de cardiotoxicidade e associadas aos efeitos de diferentes patologias, tais como alcaptanúria, artrite, feocromocitoma, hipertensão primária, carcinogenicidade, doença renal crónica, diabetes *mellitus*, doença de Parkinson e de Alzheimer, e até ao fenómeno de envelhecimento (74).

No entanto, não são só os aminocromos os responsáveis pela cardiotoxicidade demonstrada pelas catecolaminas. Outros produtos resultantes do metabolismo oxidativo das catecolaminas podem, também, exercer efeitos tóxicos, como é o caso das catecolaminas-o-quinonas (Figura 1.7 ~~Figura 1.7~~) (82, 112). As quinonas representam uma classe de intermediários tóxicos que podem provocar uma grande variedade de efeitos deletérios *in vivo*, incluindo citotoxicidade aguda, imunotoxicidade e carcinogénese (82). Adicionalmente, os mecanismos pelos quais as quinonas causam estes efeitos são extremamente complexos. Estes compostos são aceitadores de Michael e o dano celular pode ocorrer através da alquilação de proteínas celulares cruciais e/ou do DNA (82). Alternativamente, as quinonas são extremamente reactivas podendo entrar em

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

ciclos redox com os seus radicais semiquinonas, levando ao stress oxidativo pela formação de ROS.

De igual forma, as semiquinonas, como por exemplo, a leucoaminocromo-o-semiquinona, poderão exercer stress oxidativo ao nível celular (Figura 1.7) (76, 113-115). Esta hipótese foi corroborada por estudos que demonstraram que o pré-tratamento de ratos com vitamina E apresentava a capacidade de prevenir arritmias, peroxidação lipídica e necrose induzidas pela ISO (85, 98, 115). Deste modo, por exemplo, a extrema reactividade da leucodopaminocromo-o-semiquinona tem sido responsabilizada pela neurotoxicidade resultante da oxidação da DA (76, 77, 114). Adicionalmente, a formação e presença de leucoisoprenocromo-o-semiquinona foi comprovada ao nível das estruturas celulares de cardiomiócitos, como as membranas, citoesqueleto, núcleos e mitocôndrias, sendo essa presença concordante com os efeitos citotóxicos observados nos cardiomiócitos (107). Para a citotoxicidade observada poderá, também, contribuir a acção deste radical na oxidação da GSH observada nos cardiomiócitos (43, 44).

Um dos aspectos importantes para esta dissertação refere-se à possibilidade de formação, e relevância toxicológica, de aductos entre a GSH e os produtos de oxidação das catecolaminas ao nível cardíaco. A formação destes aductos foi um aspecto constatado, a nível cardíaco, em estudos prévios realizados no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (43, 44). Nesses estudos, verificou-se que a incubação de suspensões de cardiomiócitos com ISO na presença de Cu^{2+} (20 μM) induziu alterações consideráveis nos níveis de GSH:

- Ocorreu um fenómeno de stress oxidativo, constatado pelo aumento da razão GSSG/GSH+GSSG na suspensão celular para concentrações iguais ou superiores a 0,5 mM de ISO (43);
- Ocorreu a oxidação intracelular da GSH ao longo do tempo de incubação, com libertação da GSSG para o meio extracelular (44);
- Ocorreu a formação de aductos entre os produtos resultantes da oxidação da ISO e a GSH, pelo facto de se ter observado uma diminuição da glutathiona total do sistema (GSH+GSSG).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

A formação de aductos tiólicos foi, também, já descrita para os produtos da oxidação da DA, sobre os quais foram efectuados alguns estudos de toxicidade ao nível cerebral (116, 117). Contudo, a nível cardíaco, não existem, até ao momento, estudos referentes à cardiotoxicidade dos conjugados das catecolaminas com a glutathione. Pode-se, no entanto, levantar algumas hipóteses de acordo com os estudos já efectuados a nível cerebral para a DA e que serão descritos no capítulo da neurotoxicidade. Desta forma, sabendo que os conjugados com a GSH mantêm a sua reactividade (ou esta pode ser superior à do composto original), estes podem sofrer um novo processo de oxidação. Como consequência desse processo, ocorre a formação de ROS que podem contribuir para o fenómeno de stress oxidativo e que poderá explicar a cardiotoxicidade causada por estes conjugados. Além disso, e como já referido, os conjugados quinona-tioéter formados podem reagir com uma segunda molécula de GSH, ampliando a depleção de GSH ao nível dos cardiomiócitos. Desta forma, a depleção de GSH ao nível das células cardíacas poderá torná-las mais susceptíveis aos danos oxidativos resultantes das ROS formadas durante a oxidação das catecolaminas e dos próprios conjugados.

1.2.3 Neurotoxicidade

Tal como referido anteriormente, a DA é a principal catecolamina no sistema nervoso central, onde está envolvida na regulação de diversas funções (20, 21). O anormal metabolismo desta catecolamina está envolvido em diversas perturbações neuronais como a doença de Parkinson, esquizofrenia, síndrome de Tourette's e isquémia. A DA é um catecol activo que é mais facilmente autoxidável que a ADR e a NA a pH alcalino (118). A autooxidação desta catecolamina produz quinonas, semi-quinonas e ROS, tal como descrito na [Figura 1.7](#) (119). Este processo oxidativo induz uma cascata de eventos, incluindo o dano do sistema mitocondrial de transporte de electrões, o aumento na concentração de cálcio citosólico livre, e a activação de proteases e lipases originando um início precoce da morte celular (120). De facto, demonstrou-se que

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

a DA e a L-DOPA causavam morte neuronal em culturas de tecidos na presença de ferro (121, 122), e que a injeção de DA no corpo estriado causava a perda de neurónios de uma forma dependente da dose (123).

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa progressiva que resulta na perturbação das funções motoras e cognitivas e que afecta praticamente 1% dos indivíduos com mais de 65 anos de idade (124). Caracteriza-se pela perda dos neurónios nigroestriados dopaminérgicos e por diminuições nas concentrações do neurotransmissor DA (os neurónios dopaminérgicos estão envolvidos no metabolismo da DA explicando, deste modo, o facto de a doença de Parkinson ser caracterizada por uma deficiência em DA) (53). No entanto, na maioria dos casos, a causa deste processo neurodegenerativo selectivo não é conhecida (53). Contudo, existem diversas evidências que a DA endógena pode actuar como neurotoxina e, portanto, participar na patofisiologia da doença. As evidências relativas ao envolvimento da DA nesta neuropatologia derivam de observações de que a toxicidade é atenuada pela redução, farmacológica ou cirúrgica, da disponibilidade de DA estriatal (53). Foi, igualmente, sugerido que a autooxidação da DA, a qual aumenta significativamente com a idade (125), desempenha um importante papel na degeneração dos neurónios dopaminérgicos (126, 127).

A substância nigra de roedores, primatas e humanos contém níveis de GSH inferiores aos existentes noutros locais do cérebro (na ordem dos mM) (116). Além disso, os níveis de GSH na substância nigra de pacientes que faleceram com doença de Parkinson idiopática estavam diminuídos, sensivelmente na ordem dos 50% comparativamente com sujeitos controlo (128, 129). Desta forma sugeriu-se que os baixos níveis de GSH na substância nigra e o stress oxidativo consequente podem contribuir para a degeneração dos neurónios dopaminérgicos na doença de Parkinson idiopática (130, 131). Adicionalmente, durante o normal metabolismo endógeno da DA ocorre a formação de ROS, sendo a sua remoção pela GSH um mecanismo protector da substância nigra (124). Deste modo, os níveis diminuídos de GSH na substância nigra parecem representar um componente inicial no processo patológico da doença (128), sendo esta diminuição acompanhada pelo aumento dos níveis de 5-(cistein-S-il)dopamina

relativamente à DA (116). Contudo, a diminuição nos níveis de GSH na substância nigra em casos de doença de Parkinson não se deve nem a uma diminuição da actividade da γ -glutamylcisteína sintetase, a enzima limitante da biossíntese do tripéptido, nem a alterações na actividade da glutathione peroxidase, glutathione reductase ou glutathione-S-transferase (132). A exposição de DOPA ou DA ao radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) na presença de GSH pode levar à depleção de GSH (133), presumivelmente devido à reacção da GSH com as espécies quinónicas ou semi-quinónicas derivadas da DA, formando-se os respectivos aductos com a GSH [2-(cistein-S-il)-dopamina e 5-(cistein-S-il)-dopamina]. Estes monoconjugados podem, como referido anteriormente, sofrer oxidação originando uma quinona-tioéter que, dada a sua reactividade, pode reagir com uma nova molécula de GSH originando um biconjugado (2,5-bis-(cistein-S-il)dopamina) (Figura 1.10Figura 1.10).

De acordo com Spencer *et al.* (1995), a incubação de GSH ou cisteína com um sistema gerador de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , como modelo de stress oxidativo relevante para o sistema nervoso em geral e a doença de Parkinson em particular, causou taxas lentas de depleção de GSH. Tal poderá ser explicado pelo facto dos grupos tiol reagirem lentamente com o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 (ver Spencer *et al.*, 1998). Contudo, a adição de L-DOPA, DA, ADR, NA ou DOPAC, acelerou acentuadamente a perda de GSH ou cisteína, perda que poderá ser impedida pela SOD, mas não pela catalase ou pelo manitol (sequestrador de HO^{\cdot}). Este facto sugere que o $O_2^{\cdot-}$ é um intermediário essencial. Por conseguinte, dado que as catecolaminas reagem muito mais rapidamente com o $O_2^{\cdot-}$ do que com os grupos tiol, estes compostos sofrem, inicialmente, a referida oxidação a semi-quinonas e quinonas correspondentes as quais, posteriormente, reagem com a GSH ou cisteína, causando a sua depleção (116). Verificou-se também que os sistemas Fe(III)-EDTA e Cu(II), juntamente com ascorbato, apresentam a capacidade de promover a conjugação da DOPA com a cisteína a pH fisiológico, especialmente na presença de H_2O_2 . Estes factos sugerem, mais uma vez, que os iões metálicos podem mediar a oxidação da DOPA aos intermediários reactivos semi-quinónicos e quinónicos. Este processo é extremamente relevante na doença de Parkinson uma vez que, neste caso, os níveis de ferro na substância nigra se encontram

aumentados (134, 135) e existe uma produção aumentada de H_2O_2 devido ao aumentado *turnover* de DA (136). Convém, ainda, salientar que as concentrações de L-DOPA e DA, assim como de outras catecolaminas, são fisiologicamente importantes para o aparecimento dos efeitos acima referidos.

Pelo que foi acima referido se depreende que qualquer mecanismo que promova a oxidação das catecolaminas poderá provocar a depleção de GSH e, por conseguinte, o tratamento da doença de Parkinson activa com L-DOPA pode exacerbar este problema (apesar de também se verificar uma considerável depleção de GSH nas etapas pré-sintomáticas da doença, onde não foi ainda implementado qualquer tratamento) (137). Se ocorrer um aumento selectivo na geração de $O_2^{\cdot-}$, indiciado pelo aumento da actividade da SOD (137), na substância nigra em casos de doença de Parkinson, as reacções acima descritas podem contribuir para a depleção de GSH, facto facilitado pela presença de L-DOPA e DA na substância nigra e, talvez, pelo tratamento com L-DOPA.

Após a degradação química da neuromelanina da substância nigra humana surgem produtos que sugerem que este polímero é constituído por resíduos indólicos e resíduos derivados do conjugado 5-S-cisteinil-DA (138, 139). Estes últimos podem resultar da simples adição nucleofílica de cisteína ou GSH ao intermediário quinónico (140, 141). Deste modo, caso se trate da adição de GSH, o aducto 5-S-glutationil-DA sofre hidrólise catalisada por peptidases (reacções de fase III) formando-se os correspondentes conjugados com a cisteína, os quais foram já detectados em tecido cerebral de mamíferos (142-144). Estes conjugados com a cisteína podem sofrer posterior oxidação (que ocorre mais rapidamente que a DA) levando à formação de uma grande variedade de compostos, muitos deles neurotóxicos (90, 145-148), como é o caso das dihidrobenzotiazinas e conjugados da cisteína com dihidrobenzotiazina (146-149). Uma das espécies benzotiazinas que se podem formar é o ácido 7-(2-aminoetil)-3,4-diidro-5-hidroxi-2H-1,4-benzotiazina-3-carboxílico (DHTB-1) (145) o qual, segundo estudos recentes, apresenta a capacidade de atravessar a membrana externa mitocondrial, inibindo irreversivelmente o complexo I mitocondrial (150). Estas constatações sugerem que estes compostos podem ser neurotoxinas endógenas que podem contribuir para o dano irreversível do complexo I e para a

morte celular na substância nigra em casos de doença de Parkinson (150). Desta forma, estes conjugados com a cisteína podem levar à formação de outros compostos com potencial neurotóxico (148). Adicionalmente, as potentes propriedades redox destas endotoxinas são consistentes com o envolvimento do stress oxidativo na patogénese da doença de Parkinson (90).

A detecção de conjugados 5-S-cisteinil-catecolamina em amostras de cérebro humano, de indivíduos normais e de pacientes com doença de Parkinson, sugerem que estas reacções de oxidação e posterior conjugação ocorrem, de facto, *in vivo* ou que, pelo menos, a L-DOPA e a DA são oxidadas a produtos que reagem com a GSH. De acordo com estudos efectuados por Spencer *et al.* (1995 e 1998) os níveis dos conjugados com a cisteína na maioria das regiões cerebrais de doentes de Parkinson são baixos e semelhantes aos de indivíduos controlo com a mesma idade. Este facto pode ser atribuível à capacidade de estes conjugados com a cisteína poderem, como anteriormente referido, ser intraneuronalmente oxidados a compostos mais complexos como dihidrobenzotiazinas e benzotiazinas (116). Os níveis de aductos 5-S-glutationil-catecolamina podem ser baixos ao nível do tecido cerebral, provavelmente devido à acção de peptidases existentes no cérebro que os convertem nos correspondentes conjugados com a cisteína (116). Spencer *et al.* (1998) procederam à análise dos conjugados da DA, DOPA e DOPAC com a cisteína em cérebros de indivíduos normais e de indivíduos com doença de Parkinson. De acordo com o estudo efectuado, os níveis de conjugados na maioria das regiões cerebrais eram geralmente inferiores nos indivíduos com doença de Parkinson, comparativamente com indivíduos saudáveis, com excepção da substância nigra e da substância innominata. Nestas duas regiões os níveis de conjugados eram significativamente superiores, apesar dos níveis de L-DOPA e DA estarem diminuídos ao nível da substância nigra. Desta forma se conclui que uma elevada percentagem de DA/DOPA presente parece ter sido oxidada, com a consequente formação de conjugados. Cheng *et al.* (1996) sugeriu mesmo que níveis elevados de 5-S-cisteinil-DA no fluído cerebrospinal (CSF) podem constituir-se como marcador da doença de Parkinson.

Além dos conjugados cisteinil-catecol, os produtos de oxidação da DA e o seu metabolito desaminado ácido dihidrofenilacético (DOPAC) também demonstraram capacidade de se ligarem covalentemente a resíduos de cisteína de proteínas estriatais *in vitro* (151). Uma vez que os resíduos de cisteína estão, normalmente, localizados no local activo de uma proteína, uma modificação covalente provocada por uma quinona derivada de um catecol poderá resultar numa perturbação da função da proteína, com efeitos potencialmente deletérios para a célula. Por conseguinte, a ligação de uma quinona resultante da oxidação do catecol a proteínas críticas para a célula é responsável, pelo menos em parte, pela toxicidade associada à exposição a elevadas concentrações de DA.

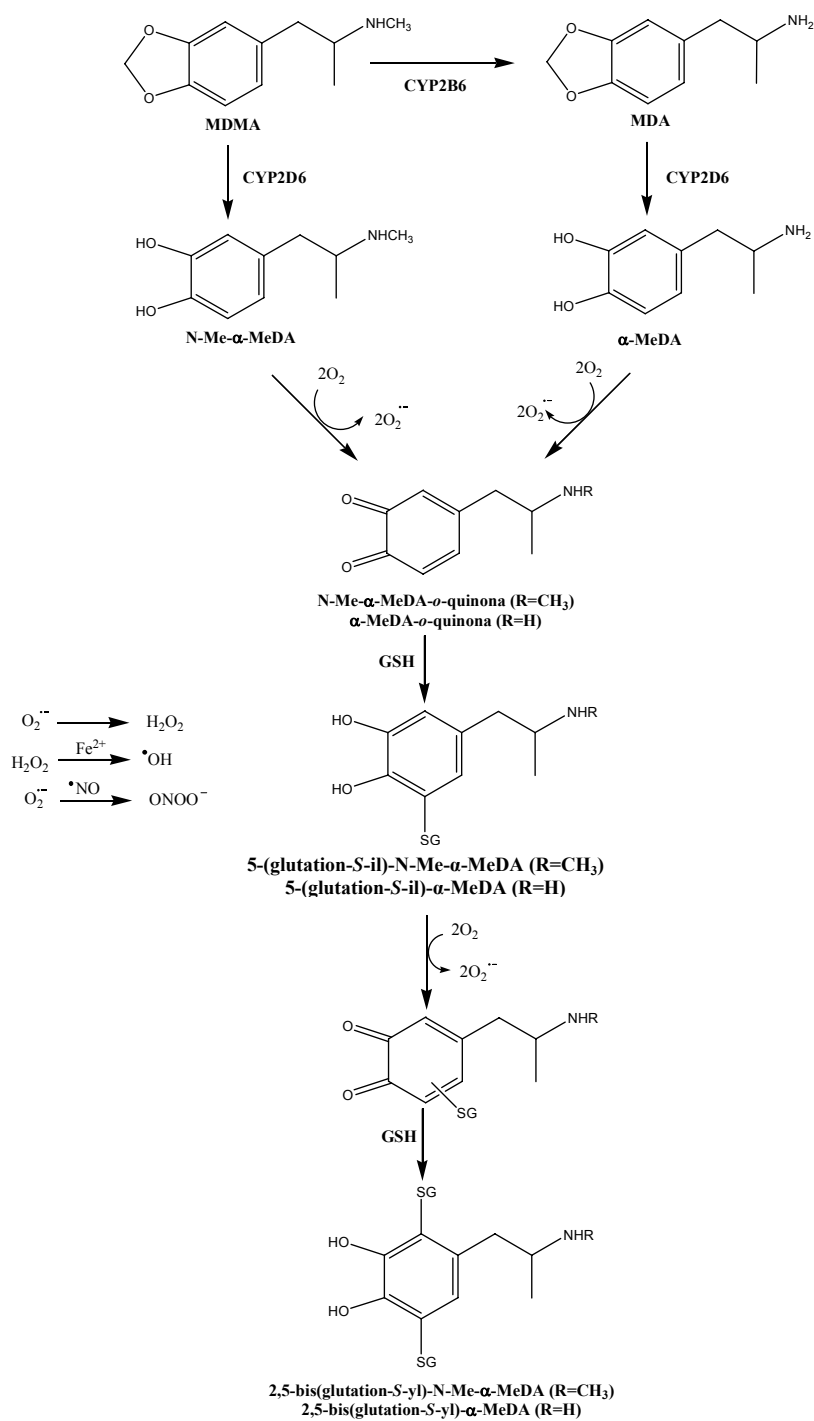
Um outro exemplo de neurotoxicidade de conjugados de compostos catecóis com a GSH relaciona-se com o potencial papel dos metabolitos quinona-tioéter na neurotoxicidade serotoninérgica de análogos da anfetamina. Pretende-se, deste modo, alertar para a importância da detecção dos aductos das catecolaminas com a GSH usando como exemplo os derivados de anfetaminas, como a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), dada a semelhança estrutural dos seus metabolitos catecóis com as catecolaminas biogénicas (presença do anel catecol).

A MDMA, vulgarmente conhecida por “ecstasy”, é uma droga recreativa extremamente popular entre os jovens na Europa e nos Estados Unidos. Constitui-se como um derivado das anfetaminas, com substituição ao nível do anel aromático, e está estruturalmente relacionada com as anfetaminas estimulantes psicomotoras e com o alucinogénio mescalina. O potencial neurotóxico da MDMA, e das anfetaminas em geral, tem sido alvo de intenso estudo nas últimas duas décadas. Este efeito tóxico parece ser comum a todos os compostos de estrutura anfetamínica, embora o perfil neurotóxico não seja idêntico.

A administração em animais de experiência de uma dose única elevada (20mg/kg) ou de múltiplas doses baixas de MDMA induz a depleção a longo-termo de marcadores neuronais serotoninérgicos, nomeadamente dos níveis de 5-HT e da actividade da triptofano hidroxilase (enzima limitante da síntese da 5-HT), e perda dos locais de captação da 5-HT (152, 153). Estes dados, juntamente com as evidências histológicas encontradas de degeneração dos terminais

nervosos serotoninérgicos, permitiram concluir que a MDMA possui uma acção neurotóxica ao nível do sistema serotoninérgico. Embora estes efeitos nefastos da MDMA ao nível do sistema serotoninérgico estejam bem definidos, os mecanismos responsáveis pela sua neurotoxicidade ainda não estão completamente esclarecidos.

Uma das teorias propostas para explicar os efeitos neurotóxicos da MDMA corresponde à possibilidade de formação de um metabolito tóxico da DA. De facto, Nash e Brodtkin (1991) constataram a existência de uma relação linear entre a libertação de DA após a administração de MDMA e a extensão da depleção a longo-termo dos marcadores neuronais serotoninérgicos. A desaminação oxidativa da DA pela MAO-B localizada nos terminais nervosos serotoninérgicos leva à formação de H_2O_2 (154, 155) que pode, por sua vez, originar radicais HO^\bullet , via reacção de Fenton (156) (~~Figura 1.5~~Figura 1.5). Desta forma, elevadas concentrações de DA no interior dos neurónios, como consequência da acção da MDMA, podem originar espécies reactivas suficientes para causar o esgotamento dos mecanismos endógenos de defesa, como é o caso dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Nestas condições, a DA sofre o processo de auto-oxidação anteriormente descrito, o qual foi já demonstrado em culturas celulares de neurónios de ratinho (77), tendo como resultado as consequências anteriormente citadas. No entanto, estudos mais recentes efectuados por Yuan *et al.* (2001, 2002) contrariam a hipótese de envolvimento da DA na neurotoxicidade da MDMA, uma vez que o tratamento com reserpina não parece ser capaz de proteger os neurónios serotoninérgicos da acção da MDMA, caso a temperatura corporal seja mantida elevada (157, 158).



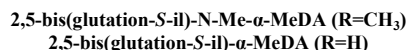


Figura 1.12 - Metabolismo oxidativo da MDMA e MDA [adaptado de (165)].

Uma segunda teoria para explicar a neurotoxicidade da MDMA diz respeito à formação de um metabolito tóxico deste composto. Foi, então, proposto que o dano oxidativo induzido pela MDMA possa resultar da formação de catecóis e quinonas reactivas por oxidação da própria molécula de MDMA e/ou do metabolito 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) (91). A MDMA (e a MDA) quando injectada intracerebroventricularmente não é neurotóxica (159), o que sugere que a neurotoxicidade desta droga está altamente dependente do seu metabolismo hepático, o qual envolve a sua N-desmetilação a MDA, que é também uma droga de abuso (Figura 1.12). A MDMA é, alternativamente, desmetilenada a N-metil- α -metildopamina (N-Me- α -MeDA) e a MDA a α -metildopamina (α -MeDA) pelos citocromos P450 2D, 2B e 3A (160, 161). Estes metabolitos reactivos são rapidamente oxidados às o-quinonas correspondentes que, por serem moléculas altamente redox-activas, podem, à semelhança do que sucede com as catecolaminas biogénicas, entrar em ciclos redox com os seus radicais semi-quinónicos levando à formação de ROS (82). Por outro lado, os intermediários reactivos o-quinónicos, como aceptadores de Michael, podem provocar dano celular através da alquilação de proteínas celulares cruciais e/ou do DNA. Na presença de GSH, a oxidação da α -MeDA à correspondente quinona é seguida da conjugação com a GSH, formando 5-(glutathione-S-yl)- α -MeDA (162, 163). Adicionalmente, o conjugado permanece redox-activo e é rapidamente oxidado ao conjugado quinona-GSH, o qual pode sofrer a adição de uma segunda molécula de GSH levando à formação de 2,5-bis(glutathione-S-yl)- α -MeDA (164) ([Figura 1.12](#)).

Trabalhos realizados nos últimos anos por Monks *et al.* sugerem que os tioéteres formados pela adição de GSH são intervenientes importantes nos efeitos neurotóxicos da MDMA (90, 165). Sabe-se, de facto, que estes compostos não são desprovidos de reactividade e, por vezes, esta reactividade pode ser aumentada após conjugação com a GSH ou a cisteína. Foi este mesmo aspecto que Capela *et al.* (2005) constataram quando avaliaram a neurotoxicidade da

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

MDMA e dos seus metabolitos, N-Me- α -MeDA, α -MeDA e (5-glutation-S-il)- α -MeDA, em culturas de neurónios corticais de rato. Neste estudo verificou-se que os metabolitos se revelaram mais neurotóxicos que a MDMA, sendo o conjugado com a GSH o que demonstrou ser mais tóxico (166). Deste modo, apesar de se considerar que a conjugação de compostos electrofilicos com a GSH constitui um processo de destoxificação ao favorecer a sua eliminação na forma de derivados mercaptúricos, diversos exemplos têm sido descritos nos quais se observa que a conjugação das quinonas com a GSH contribui para a bioactivação destes compostos e não para a eliminação da sua reactividade química ou biológica (90, 167, 168). Adicionalmente, e tal como referido anteriormente, os conjugados polifenólicos podem ainda sofrer oxidação com formação de quinonas-tioéteres que, dada a sua reactividade, podem ligar-se a uma nova molécula de GSH, formando os biconjugados (2,5-bis(glutation-S-il)- α -MeDA). Bai *et al.* (1999) verificaram, igualmente, que os conjugados da α -MeDA com a GSH [5-(glutation-S-il)- α -MeDA e 2,5-bis(glutation-S-il)- α -MeDA] e com a N-acetilcisteína, quando injectados directamente no cérebro de rato, induzem depleção a longo-termo dos níveis de 5-HT cerebral, mas não alteram as concentrações de DA ou NA (169).

Os tioéteres são compostos hidrofílicos com pouca capacidade para penetrar a barreira hemato-encefálica (BHE). Monks e Lau (1997) propuseram um mecanismo que permite explicar a passagem do conjugado catecol-GSH através da BHE (84, 90), que envolve a existência de transportadores de GSH localizados na membrana endotelial. Deste modo, uma vez no cérebro, este conjugado sofre a acção da γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT), presente em elevadas concentrações na membrana endotelial da BHE (170), e de dipeptidases originando o correspondente conjugado cisteína-polifenol. Este conjugado é, subsequentemente, acetilado a N-acetilcisteína-polifenol, que é potencialmente neurotóxico (90). Ao contrário dos precursores, 5-(glutation-S-il)- α -MeDA e 5-(cistein-S-il)- α -MeDA, a 5-(N-acetilcistein-S-il)- α -MeDA é eliminada do cérebro muito mais lentamente e a impossibilidade de ciclizar internamente (o grupo amina do resíduo cisteinil está bloqueado) permite-lhe manter a sua actividade redox e contribui para a sua maior toxicidade (90, 169). Apesar de apresentar menor expressão do ponto de vista quantitativo, o conjugado com a cisteína

formado no lúmen capilar pode ser transportado através das células endoteliais por intermédio de transportadores específicos para aminoácidos (90). Adicionalmente, em estudos recentes efectuados por Bai *et al.* (2001), verificou-se que a inibição da γ -GT potencia a depleção da 5-HT e do seu metabolito, ácido 5-hidroxiindoleacético, induzida pela administração de MDA ou MDMA (165). Uma possível explicação para este efeito é, provavelmente, a diminuição do metabolismo dos conjugados da α -MeDA ou da N-Me- α -MeDA com a GSH, presentes no lúmen dos capilares cerebrais, resultando no aumento da quantidade de conjugados “intactos” capazes de sofrer transporte através dos transportadores de GSH existentes nas células endoteliais. Convém, também, salientar, que os conjugados de vários polifenóis com a GSH diminuem a actividade da γ -GT (91) contribuindo, provavelmente, para um transporte exacerbado destes conjugados para o cérebro.

1.2.4 Hepatotoxicidade

O consumo de MDMA como droga recreacional tem sido responsável pelo aparecimento de vários casos de falência hepática aguda em jovens. A lesão hepática induzida pela MDMA abrange desde formas benignas, análogas a hepatites víricas (171-173), até formas severas, como falência hepática subsequente a necrose hepática maciça (174-177). Os mecanismos envolvidos na lesão hepática induzida pela MDMA e anfetaminas em geral não estão ainda completamente esclarecidos. Alguns investigadores consideram que este efeito tóxico possa resultar de uma reacção idiossincrática, dada a existência de vários casos em que o seu consumo não provoca lesão hepática (172, 174). No estudo efectuado por Andreu *et al.* (1998) verificou-se a presença de elevado número de eosinófilos no tracto portal, o que poderá estar relacionado com algum mecanismo de hipersensibilidade (178). Contudo, diversos factores poderão influenciar a hepatotoxicidade da MDMA, nomeadamente o teor de catecolaminas, a oxidação das aminas biogénicas, as variações do fluxo sanguíneo hepático, a hipertermia, além do possível efeito directo da MDMA e/ou dos seus metabolitos.

Um mecanismo proposto para explicar a hepatotoxicidade da MDMA é a activação, pelas aminas biogénicas libertadas por acção deste composto, dos receptores adrenérgicos localizados na artéria hepática. Como resultado ocorre a vasoconstrição desta artéria, podendo surgir hipóxia e consequente lesão hepática (179). Adicionalmente, a activação desses receptores parece estar associada à diminuição dos níveis de GSH (180, 181), ao aumento da respiração mitocondrial e da concentração de cálcio livre intracelular (182), fenómenos potencialmente tóxicos para a célula.

Um outro mecanismo proposto para explicar a hepatotoxicidade desta droga de abuso é a oxidação das aminas biogénicas libertadas por acção da MDMA. Leonardo e Azmitia (1994) demonstraram a inibição competitiva da MAO-A (preferencialmente) e MAO-B pela MDMA (183). Nestas circunstâncias, as catecolaminas podem sofrer auto-oxidação (~~Figura 1.7~~~~Figura 1.7~~) com as consequências já anteriormente abordadas.

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Outro factor importante na indução da lesão hepática parece resultar do metabolismo oxidativo destes compostos. Foi já descrito que a MDMA é metabolizada em microssomas de fígado de rato pelo sistema citocromo P450 a aductos com a GSH (84). O mecanismo de formação do aducto é em tudo semelhante ao descrito para a neurotoxicidade da MDMA (~~Figura 1.12~~~~Figura 1.12~~). Em conformidade, foi observado que a MDMA induz a depleção de GSH em estudos *in vivo* em ratos (184) e ratinhos (185) e em estudos *in vitro* em hepatócitos isolados de ratinhos (186) e de rato (187). Deste modo, a depleção dos níveis hepáticos de GSH poderá constituir um passo inicial para a acção hepatotóxica da MDMA. Contudo, permanece por demonstrar se a depleção de GSH é suficiente para causar a morte celular ou se expõe as células a outros efeitos tóxicos, também induzidos pela MDMA, como por exemplo a hipertermia.

Formatted: Font: 11 pt, Not Bold

O mecanismo de depleção da GSH foi abordado em estudos realizados em suspensões de hepatócitos isolados de rato incubados com MDMA e os seus metabolitos, nomeadamente a MDA (188), a N-Me- α -MeDA (187) e a α -MeDA (188). Para todos os compostos testados, a diminuição dos níveis de GSH foi dependente da concentração e do tempo de incubação. Adicionalmente, verificou-se que a depleção de GSH induzida pelos catecóis N-Me- α -MeDA (nas

concentrações de 0,8 mM e 1,6 mM) e α -MeDA (na concentração de 1,6 mM) era mais acentuada do que a induzida pela MDMA e o seu metabolito MDA (este dois demonstraram causar um grau idêntico de depleção), sendo acompanhada por uma maior perda de viabilidade celular e diminuição mais acentuada da actividade das enzimas antioxidantes GPX, GR e GST. Por outro lado, ao contrário do que sucedeu com as concentrações mais elevadas, para as concentrações mais baixas não se observaram diferenças significativas entre a depleção da GSH induzida pela MDMA ou MDA e a dos seus metabolitos. Estes factos sugerem a saturação do metabolismo hepático (etapa da desmetilenação) na presença de concentrações mais elevadas destes compostos.

Ainda no âmbito dos estudos acima referidos, verificou-se que a depleção de GSH induzida pela MDMA e pelos seus metabolitos não foi acompanhada por um aumento proporcional de formação de GSSG (186-189), o que indicia a formação de conjugados com a GSH. Em concordância, foram identificados e caracterizados, pelo mesmo grupo de investigação, os aductos da GSH com a α -MeDA, nomeadamente a 2-(glutathion-S-il)- α -MeDA e a 5-(glutathion-S-il)- α -MeDA, em hepatócitos isolados incubados com a MDA ou a α -MeDA (188). A formação de conjugados da α -MeDA (190) e da N-Me- α -MeDA (162) com a GSH foi também observada em preparações de microsomas de fígado humano e de rato, respectivamente. Contudo, ao contrário dos resultados discutidos anteriormente, nos estudos em hepatócitos isolados, os mesmos autores verificaram que a MDMA e a MDA não exercem toxicidade em células tubulares proximais (CTPs) renais de rato e humanas (189) ou em cardiomiócitos isolados de rato (191) nas condições adoptadas nos ensaios. No entanto, os metabolitos desmetilenados da MDMA induziram toxicidade significativa em todos os modelos *in vitro* usados (187-189, 191). Deste modo, os resultados obtidos sugerem que o metabolismo da MDMA com formação da N-Me- α -MeDA e α -MeDA é essencial para a expressão da hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade induzida pela MDMA, pelo menos, *in vitro*.

Um outro facto bem conhecido acerca da toxicidade da MDMA relaciona-se com a indução de hipertermia, uma condição pró-oxidante que pode levar a danos hepatocelulares irreversíveis *in vitro* (192). De facto, foram observados *in vivo*

danos hepatocelulares na hipertermia semelhantes aos observados em consumidores de “ecstasy” (193). Estudos realizados por Carvalho *et al.* (1997) com hepatócitos isolados de rato revelaram que a elevação da temperatura de incubação de 37 °C para 41 °C causava a diminuição dos níveis de GSH, aumento de GSSG, peroxidação lipídica e morte celular (194). Deste modo, tendo em consideração a diminuição dos níveis de GSH e a hipertermia como consequência da ingestão de MDMA, parece plausível que estas condições podem ter efeitos deletérios sinérgicos. Com o objectivo de avaliar a existência desta sinergia Carvalho *et al.* (2001) avaliaram e compararam a extensão da diminuição dos níveis de GSH mediada pela MDMA, a peroxidação lipídica e a perda de viabilidade celular em hepatócitos isolados de ratinho sob condições normotérmicas (37 °C) e hipertérmicas (41° C) (186). Nesse estudo constatou-se a potenciação da depleção de GSH mediada pela MDMA pelas condições de hipertermia, facto que poderá dever-se a um aumento do metabolismo desta droga de abuso e contribuir para a hepatotoxicidade já verificada em humanos (186).

Apesar dos efeitos concomitantes da MDMA (aumento da temperatura corporal e efeito directo da droga nos níveis de GSH através da formação dos correspondentes aductos) não terem sido, até ao momento, reportados em humanos, é provável que estes efeitos possam ocorrer uma vez que estes também expressam as enzimas envolvidas no referido metabolismo (160).

O metabolismo hepático da MDMA parece ser, também, essencial para o efeito apoptótico desta droga de abuso. Estudos recentes de Montiel-Duarte *et al.* (2002 e 2004) demonstraram que a MDMA tem uma acção pró-apoptótica em hepatócitos isolados de rato e em culturas de células Ito (195, 196). Verificou-se, igualmente, que a apoptose induzida pela MDMA em culturas de células Ito foi acompanhada por uma diminuição dos níveis intracelulares de GSH e formação de ROS (196). O pré-tratamento com o antioxidante ditiocarbamato de pirrolidina anulou a produção de ROS mas não preveniu a apoptose induzida pela MDMA, sugerindo que o mecanismo apoptótico da MDMA é independente do stress oxidativo. Adicionalmente, verificou-se a potenciação da acção apoptótica da MDMA, pela adição de GSH ou N-acetilcisteína, e a redução da extensão da

apoptose induzida pela MDMA, pelo pré-tratamento das células com quinina (inibidor do citocromo P450 2D6). Desta forma, estes resultados sugerem que um metabolito da MDMA, possivelmente após conjugação com a GSH, possa contribuir para a apoptose induzida por esta droga.

1.2.5 Nefrotoxicidade

Aparecem descritos na literatura vários casos de danos renais secundários ao consumo de MDMA, que incluem falência renal aguda ou crónica (174, 197-201), vasculite renal necrosante (202) e lesão aguda dos túbulos proximais (203). Contudo, apesar de terem sido reportados os casos acima citados, os mecanismos pelos quais esta droga exerce a sua nefrotoxicidade permanecem por esclarecer (189).

Diversos factores podem contribuir para os efeitos nefrotóxicos da MDMA, nomeadamente a coagulação intravascular disseminada (CID), vasoconstrição, rabdomiólise, hipertermia e o seu próprio metabolismo (189). A CID e a rabdomiólise constituem-se como consequências clínicas frequentes do abuso de “ecstasy”, das quais podem resultar diversos graus de obstrução microvascular devido à deposição de fibrina-plaquetas ou mioglobina, respectivamente (197, 199). Estes processos de deposição podem resultar em isquémia renal súbita e necrose tubular aguda. Adicionalmente, o metabolismo oxidativo da MDMA resulta na formação de metabolitos redox-activos, os quais foram já implicados nos mecanismos responsáveis pela nefrotoxicidade induzida pela MDMA. Deste modo, num estudo publicado por Carvalho *et al.* (2002) pretendeu-se averiguar o papel destes metabolitos na nefrotoxicidade induzida por esta droga de abuso (189). Nesse estudo verificou-se que nem a MDMA nem a MDA (em qualquer concentração testada, 100 a 800 μM) são tóxicas para culturas primárias de células tubulares proximais renais (CTPs) de rato e humanas, visto que não foram observadas alterações ao nível da função mitocondrial (189). Pelo contrário, os metabolitos catecóis destes compostos ([Figura 1.12](#)) são capazes de causar citotoxicidade em culturas primárias de CTPs de rato e de humano. Deste modo, a exposição destas células a $\alpha\text{-MeDA}$ (800 μM) induziu uma significativa diminuição da viabilidade celular avaliada pela diminuição da função mitocondrial,

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

causando 60% e 40% de morte celular em CTPs de rato e humanas, respectivamente (189). Adicionalmente, a α -MeDA pode sofrer um posterior acoplamento oxidativo dando origem a produtos diméricos e poliméricos. Concordantemente, Carvalho *et al.* (2002) observaram a presença de pigmentos negros insolúveis em monocamadas de células CTPs expostas a α -MeDA, que é indicativa da ocorrência das referidas reacções de polimerização com formação de pigmentos do tipo melanina (189). A persistência deste pigmentos insolúveis pode provocar obstrução e irritação tubular, fenómenos que podem contribuir para a toxicidade crónica da MDMA.

Estas constatações indicam, deste modo, que o metabolismo é necessário para a toxicidade renal da MDMA e da MDA, pelo menos *in vitro*. Os rins dos mamíferos são capazes de metabolizar xenobióticos através de uma variedade de vias, incluindo a oxidação dependente do citocromo P450 e a conjugação com a GSH, sulfato e ácido glucorónico (204). No entanto, não se sabe se a quantidade de metabolitos da MDMA formados directamente no interior das células renais é suficiente para produzir essa toxicidade (189). Adicionalmente, as actividades das isoenzimas do citocromo P450 diminuem consideravelmente em culturas primárias de CTPs, principalmente durante as primeiras 24 horas de cultura (205). Estes efeitos podem, deste modo, justificar a falta de toxicidade da MDMA e MDA nestas culturas celulares (189).

Dada a reactividade dos metabolitos resultantes da oxidação da MDMA e da MDA estes podem, como referido anteriormente, sofrer conjugação com a GSH (162). Numerosos estudos revelaram a nefrotoxicidade dos conjugados da GSH com vários polifenóis em animais de experiência [para revisão ver (90, 91, 206, 207)]. Esta nefrotoxicidade é uma consequência da actividade particularmente elevada de γ -GT na membrana apical das células tubulares proximais renais. As reacções de hidrólise ou transpeptidação catalisadas por esta enzima têm lugar extracelularmente, e o produto final da reacção, o dipéptido cisteinilglicina, é o substrato para as dipeptidases (aminopeptidase M) que têm a mesma localização. Os correspondentes conjugados da cisteína são, então, transportados pela membrana das células epiteliais do túbulo proximal através de um sistema de transporte de aminoácidos, acabando por exercer a sua toxicidade no interior da

célula, normalmente por um mecanismo de ataque electrofílico a macromoléculas vitais (90). Desta forma, o metabolismo dos conjugados polifenóis-GSH pela γ -GT está associado à acumulação celular do conjugado polifenol-cisteína correspondente. No interior da célula, o conjugado com a cisteína pode, ainda, ser convertido no respectivo ácido mercaptúrico, numa reacção catalisada pela acetiltransferase. Pode, alternativamente, sofrer a acção da enzima β -liase com formação de um tiol reactivo, por um mecanismo de β -eliminação, e subsequente inactivação pela enzima S-metiltransferase (208). Esta via metabólica catalisada pela β -liase tem sido implicada na nefrotoxicidade de vários conjugados com a GSH ou cisteína.

Tal como outros conjugados de polifenóis com a GSH que são potentes nefrotóxicos (206), os metabolitos tioéter da MDMA retêm a capacidade de entrar em ciclos redox com a geração de ROS. Num estudo efectuado em monocamadas de CTPs humanas e de rato por Carvalho *et al.*, os conjugados da α -MeDA com a GSH foram claramente mais tóxicos do que o catecol do qual derivaram. Neste estudo, 400 μ M de 5-(glutathion-S-il)- α -MeDA induziu morte celular em cerca de 70 e 80% de CTPs humanas e de rato, respectivamente (189). Adicionalmente, o aducto 5-(glutathion-S-il)- α -MeDA (400 μ M) demonstrou ser mais tóxico que o biconjugado 2,5-bis(glutathion-S-il)- α -MeDA para CTPs de rato, apesar de serem equipotentes em CTPs humanas, sugerindo que as células humanas são mais sensíveis ao biconjugado do que as células de rato correspondentes (189). As razões para estas diferenças em termos de susceptibilidade ao biconjugado são pouco claras até ao momento tendo, no entanto, sido verificadas diferenças na actividade específica renal da γ -GT em diferentes espécies (206). Essas diferenças entre espécies resultam não só de diferenças na concentração da enzima mas, também, de diferenças na proteína γ -GT.

Carvalho *et al.* (2002) avaliaram o papel da γ -GT e da aminopeptidase M na citotoxicidade mediada pelos aductos 5-(glutathion-S-il)- α -MeDA e 2,5-bis(glutathion-S-il)- α -MeDA. Para o efeito, células CTPs de rato foram sujeitas a um pré-tratamento com acivicina, um inibidor da γ -GT, ou a bestatina, um inibidor da aminopeptidase M, antes da exposição das monocamadas de células a esses

conjugados. A inibição dessas enzimas potenciou a citotoxicidade mediada pelo monoconjugado mas não exerceu qualquer efeito na citotoxicidade mediada pelo biconjugado. Deste modo, apesar do monoconjugado (300 μM) e do biconjugado (400 μM) diminuírem a viabilidade celular nestas concentrações, essas diminuições não foram estatisticamente significativas. Contudo, após pré-tratamento com bestatina e acivicina, a mesma concentração de monoconjugado causou uma diminuição significativa da viabilidade celular (45 e 65%, respectivamente) (189). Em virtude da citotoxicidade do monoconjugado em CTPs de rato ser potenciada pela inibição da γ -GT e da aminopeptidase M renais, foi proposto que o metabolismo do conjugado ao correspondente conjugado cistein-S-il-glicina e/ou cisteinil-S-il é uma via de destoxicação. Pelo contrário, o pré-tratamento com esses inibidores não teve qualquer efeito na citotoxicidade mediada pelo biconjugado, sugerindo que o aumento do número de moléculas de GSH resulta na diminuição da afinidade das enzimas para o conjugado (189).

Estas constatações sugerem, deste modo, que a degradação dos conjugados com a GSH pela γ -GT pode ser um mecanismo de destoxicação. Uma possível explicação para este efeito é o facto de a inibição dessa enzima prevenir a formação de um composto do tipo benzotiazólico através da ciclização do conjugado cistein-S-il-glicina e/ou cistein-S-il (209). Deste modo, a hidrólise do aducto 5-(glutathion-S-il)- α -MeDA mediada pela γ -GT e a posterior clivagem da glicina (mediada pela aminopeptidase M) leva à ciclização oxidativa do conjugado com a cisteína (189), levando à formação de um composto do tipo benzotiazólico. Dado que esta reacção elimina o grupo catecol reactivo da molécula são, efectivamente, prevenidos os ciclos redox do tioéter. Desta forma, a reacção de ciclização intramolecular pode ser considerada uma reacção de destoxicação, com a inibição do metabolismo destes conjugados a resultar num elevado aumento da concentração dos conjugados com a GSH. Adicionalmente, os compostos quinona-tioéteres são capazes de inibir diversas enzimas que utilizam a GSH como substrato ou co-substrato, incluindo a própria γ -GT (91), de modo que este efeito dos conjugados da α -MeDA com a GSH na actividade desta enzima, ao nível das membranas das CTPs, pode, subsequentemente, aumentar as concentrações dos metabolitos nefrotóxicos da MDMA (189).

O mecanismo de toxicidade mediado pelo conjugado quinona-GSH é pouco claro mas, com base nas propriedades conhecidas das quinonas, parece ser iniciado ou pela alquilação de macromoléculas celulares essenciais à estrutura celular, ou via geração de ROS durante o ciclo redox dos compostos quinónicos. Uma vez que a clivagem da molécula de GSH presente no aducto se constitui como pré-requisito para a captação celular dos conjugados, os resultados observados por Carvalho *et al.* (2002) sugerem a existência de um mecanismo extracelular de toxicidade (189). Deste modo, dada essa capacidade de entrar em ciclos redox, é possível que estes compostos possam induzir peroxidação lipídica das membranas celulares, além de poderem interagir com grupos tiol de proteínas funcionais localizadas extracelularmente, as quais desempenham um papel crítico na função celular.

Pelo que foi acima referido se depreende que, também neste caso, o metabolismo destes compostos parece desempenhar um importante papel no desenvolvimento de nefrotoxicidade *in vitro*. Deste modo, a MDMA sofre metabolização no fígado com formação de aductos com a glutathione. O posterior efluxo hepático e metabolismo de fase III dos conjugados com a glutathione pela γ -GT (existente em elevada quantidade no rim), dipeptidase e N-acetiltransferase resultam na formação de conjugados com a cisteína e N-acetilcisteína. De realçar que os conjugados com a GSH, cisteína e N-acetilcisteína formados na metabolização da MDMA são potencialmente tóxicos para o rim e outros órgãos, uma vez que se mantém o grupo catecol e a estrutura α -metilfeniletilamínica do composto inicial. Desta forma, os conjugados formados podem, também, originar ciclos redox e induzir stress oxidativo ou, alternativamente, podem atacar locais nucleofílicos intracelulares e causar morte celular (210).

OBJECTIVOS DO TRABALHO

Objectivos do Trabalho _____

2. OBJECTIVOS DO TRABALHO

As catecolaminas libertadas pelo sistema nervoso simpático e medula adrenal estão envolvidas na regulação de um grande número de funções fisiológicas, especialmente no que respeita a respostas integradas a um conjunto de situações de stress que, de outro modo, comprometeriam os mecanismos homeostáticos. Adicionalmente, é do conhecimento geral o importante papel fisiológico desempenhado pelas catecolaminas no processo de neurotransmissão. Contudo, a utilização destes compostos como agentes terapêuticos ou o aumento dos seus níveis fisiológicos em consequência de fenómenos patológicos podem resultar, tal como descrito anteriormente, em situações de cardiotoxicidade, neurotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Diversos mecanismos para a toxicidade exercida pelas catecolaminas foram já descritos, sendo o stress oxidativo resultante da sua oxidação uma das vias propostas mais referidas por diferentes autores (46, 49-51). Em consonância, estudos prévios revelaram que alguns produtos resultantes da oxidação das catecolaminas podem sofrer conjugação com a glutathione em hepatócitos e cardiomiócitos isolados de rato, resultando na formação de espécies ainda mais tóxicas (43, 44, 107, 187-189, 191, 211, 212). Adicionalmente, a presença de aductos da dopamina com a GSH em amostras biológicas foi já demonstrada (52, 83, 84, 90, 91, 116, 131, 213). Contrariamente, não há estudos que refiram a detecção de aductos da adrenalina (ou a noradrenalina) com a GSH. Deste modo, a identificação e quantificação destas espécies reactivas em amostras biológicas é de extrema importância. Por conseguinte, o objectivo da presente dissertação foi o desenvolvimento e validação de uma metodologia de HPLC-ED (*High Performance Liquid Chromatography with electrochemical detection*) para a detecção e futura quantificação de aductos das catecolaminas, em especial a adrenalina, com a GSH em amostras biológicas. O desenvolvimento deste estudo exigiu a execução de diversos trabalhos no sentido de resolver os diferentes problemas que foram surgindo e também no sentido de melhorar alguns passos da metodologia implementada. De um modo geral pode estruturar-se o estudo desenvolvido em 5 fases:

- FASE I - Síntese dos aductos das catecolaminas com a GSH e optimização das condições cromatográficas para a sua detecção. Esta fase pode ser dividida em três subfases que compreendem:
 - Síntese dos aductos da GSH com a adrenalina, noradrenalina e dopamina usando a tirosinase como catalisador reaccional.
 - Definição das proporções do solvente orgânico e do solvente aquoso que compõem a fase móvel a utilizar ao longo do trabalho experimental, de forma a otimizar o processo de separação dos aductos.
 - Definição dos potenciais de trabalho a aplicar aos eléctrodos do detector electroquímico (E_1 e E_2), para optimização da detecção dos aductos.
- FASE II - Caracterização dos aductos das catecolaminas com a GSH. No âmbito da presente fase foram caracterizados os aductos da adrenalina com a GSH com base em três procedimentos:
 - Análise dos espectros de UV/VIS.
 - Análise dos espectros de massa.
 - Análise comparativa dos cromatogramas resultantes da injeção de uma amostra com aductos sintetizados e de um padrão de um monoconjugado da adrenalina com a GSH [5-(glutathione-S-yl)-adrenalina].

Foram, igualmente, caracterizados os aductos da noradrenalina e da dopamina com a GSH tendo por base a análise dos respectivos espectros de UV/VIS.

- FASE III - Optimização das condições de detecção dos aductos das catecolaminas com a GSH. No âmbito da presente fase foram efectuados estudos de linearidade da resposta do detector electroquímico face à presença dos monoconjugados da adrenalina, noradrenalina e dopamina com a GSH. Foram, igualmente, avaliadas as condições de estabilidade dos aductos em função do pH e da temperatura. Estes estudos tiveram

como objectivo estabelecer e definir as condições de tratamento das amostras, conservação e análise dos aductos.

- FASE IV - Desenvolvimento de uma metodologia para a extracção dos aductos das catecolaminas com a GSH. Esta fase teve como objectivo a adaptação do procedimento de extracção das catecolaminas pela alumina à extracção dos compostos alvo da presente dissertação (aductos das catecolaminas com a GSH). Deste modo, a presente fase envolveu a avaliação e optimização de diversos parâmetros do processo, nomeadamente:
 - Avaliação de eventuais perdas de aductos durante o processo extractivo.
 - Concentração de EDTA no tampão Tris/EDTA.
 - Selecção do tipo e volume de solvente extractor.
 - Duração da agitação da amostra com a alumina, durante o processo de adsorção dos aductos.
 - Avaliação do efeito da temperatura e ultra-sons na dessorção dos compostos.

Esta fase compreendeu, igualmente, o estudo da possibilidade da utilização do aducto 5-(glutation-S-il)- α -metildopamina (5-GSH- α -MeDA) como padrão interno e o estudo de avaliação da formação espontânea de aductos (na ausência de tirosinase).

- FASE V- Validação da metodologia implementada para a detecção dos aductos da adrenalina com a GSH em soro humano. Esta fase compreendeu a avaliação de diversos parâmetros analíticos que permitem a avaliação do desempenho de métodos analíticos e a sua consequente validação. Os parâmetros foram avaliados no que respeita à detecção dos monoconjugados da adrenalina com a GSH e compreenderam os estudos de selectividade, precisão, linearidade e calibração, a determinação do limite de detecção e a avaliação das recuperações do processo de extracção.

Objectivos do Trabalho _____

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese dos aductos das catecolaminas com a GSH

Os aductos das catecolaminas com a GSH não se encontram disponíveis comercialmente. Dada esta limitação, foi necessário proceder à síntese dos referidos aductos no laboratório. O procedimento para a síntese dos conjugados das catecolaminas com a GSH encontra-se esquematizado na Figura 3.1. Efectuou-se uma mistura reaccional contendo (concentrações finais na pré-mistura de reacção):

- Tirosinase (Sigma, 0,4 U/mL);
- Glutathione, 3,75 mM (Sigma, PM=307,3 g/mol).
- Catecolamina. A catecolamina mais utilizada na síntese de aductos com a GSH foi a adrenalina [Sigma, bitartarato de (-)-Epinefrina ou (4-[1-hidroxi-2-(metilamino)etil]-1,2-benzenediol); PM=333,3 g/mol]. A concentração final de adrenalina na pré-mistura de reacção variou entre 25 nM e 3,75 mM. Em alguns dos estudos efectuados, procedeu-se à síntese de aductos da dopamina [Sigma, hidrocloreto de dopamina; PM=189,64 g/mol] e da noradrenalina [Fulka, L-Noradrenalina Hidrogen L-Tartarato monohidratado; PM=337,29 g/mol] com a GSH. A concentração final de dopamina na pré-mistura de reacção variou entre 1,2 µM e 3,75 mM e a de noradrenalina variou entre 0,6 µM e 3,75 mM.

Todas as soluções acima referidas foram preparadas em tampão fosfato 0,1 M (Merck, sódio dihidrogenofosfato monohidratado; PM=137,99 g/mol) com pH ajustado a 7,4.

Posteriormente, esta mistura de reacção foi agitada em vortex, durante 2 minutos, à qual se seguiu um período de repouso, à temperatura ambiente, de 10 minutos. Durante a agitação e o repouso ocorre a formação dos aductos. Posteriormente, 100 µL desta mistura contendo os aductos foram adicionados a 400 µL de tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4) ou de soro humano. Após agitação,

procedeu-se imediatamente à adição de 250 µL de ácido perclórico (PCA) a 15% (concentração final 5%) para interrupção da reacção, precipitação das proteínas e estabilização dos aductos. A mistura foi, então, centrifugada a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C. Recolheu-se, por fim, o sobrenadante onde estão presentes os aductos. As amostras (sobrenadante) foram utilizadas para análise directa por HPLC ou submetidas a um processo extractivo pela alumina.

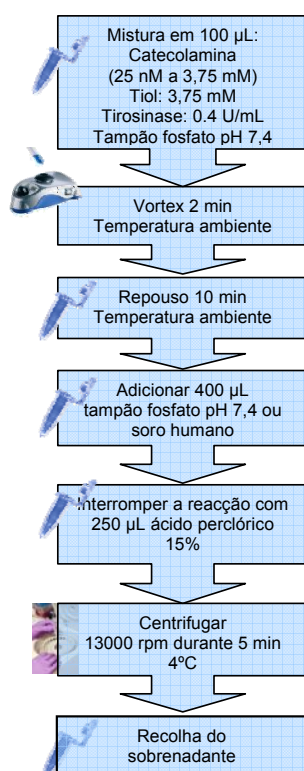
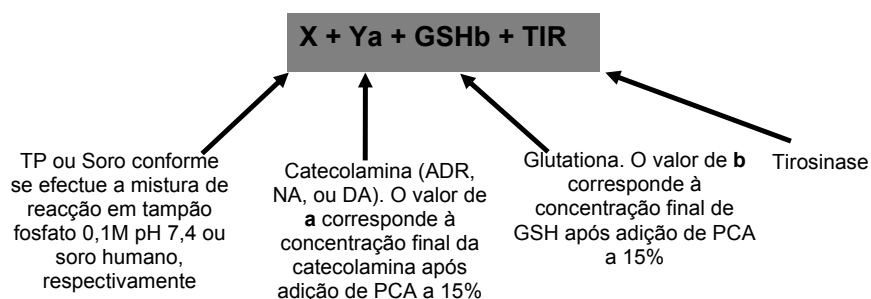


Figura 3.1- Protocolo experimental para a síntese de aductos das catecolaminas com a GSH.

Dada a ausência de padrões de aductos comercialmente disponíveis, foi necessário expressar as concentrações dos aductos formados em termos de concentração da catecolamina que esteve na origem da respectiva síntese, após a interrupção da reacção pela adição de ácido perclórico a 15%. No que respeita à concentração de GSH, esta refere-se, igualmente, à concentração final após a

interrupção da reacção pela adição de ácido perclórico a 15%. Deste modo, considerando esta solução final, a concentração correspondente de GSH e de catecolamina que deu origem à formação dos aductos foi de 0,5 mM para a GSH e variou entre 3,3 nM e 0,5 mM para a catecolamina.

As misturas reaccionais efectuadas para a síntese dos aductos podem ser esquematicamente representadas da seguinte forma, que será daqui em diante adoptada ao longo do texto:



3.2. Separação e detecção dos aductos das catecolaminas com a GSH

3.2.1 Sistema cromatográfico e coluna

A selecção do sistema cromatográfico e da coluna cromatográfica teve como base estudos prévios desenvolvidos no Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (188).

O sistema cromatográfico utilizado no âmbito do presente trabalho experimental foi um sistema de HPLC (Waters, modelo 2690), equipado com um detector de UV/VIS, um detector electroquímico e um espectrómetro de massa Q-TOF 2 (Micromass). O detector UV/Vis utilizado no presente trabalho experimental foi um detector de fotodíodos (Waters, modelo 996 Photodiode Array detector). Neste tipo de detectores de fotodíodos, a amostra é exposta a radiação policromática. Deste modo, a luz atinge uma “grade” que separa os comprimentos

de onda da radiação do mesmo modo que um prisma e, desta forma, gamas apertadas de comprimentos de onda atingem elementos discretos de uma sucessão de fotodíodos. Obtém-se, deste modo, o espectro no UV de cada um dos analitos no momento da sua detecção, auxiliando desta forma a identificação dos compostos que eluem da coluna cromatográfica. Este detector foi utilizado no âmbito da caracterização dos aductos das catecolaminas com a GSH, através da análise dos máximos de absorvância característicos destes compostos.

O detector electroquímico utilizado foi o ESA Coulochem II que fornece uma elevada sensibilidade (de onde resulta um limite de detecção dificilmente atingido com outro tipo de detectores), elevado grau de selectividade e uma vasta gama de aplicabilidade. As células do detector electroquímico Coulochem II são células analíticas de baixo volume que contêm dois eléctrodos de trabalho, cuja elevada área de superfície de cada eléctrodo resulta em 100% de reacção do composto electroactivo. O primeiro eléctrodo (E_1 , eléctrodo de *screening*) pode ser usado para eliminar compostos potencialmente interferentes da detecção subsequente no segundo eléctrodo (E_2 , eléctrodo analítico). Foi utilizada a célula ESA modelo 5011A como célula analítica. Esta célula analítica, de elevada sensibilidade, é usada para facultar o potencial para a oxidação (ou redução) das espécies de interesse. Adicionalmente, foi colocada entre a bomba e o injector uma célula electroquímica, designada por *Guard Cell*, a qual oxida (ou reduz) qualquer material electroactivo que possa estar presente na fase móvel. A oxidação (ou redução) das espécies electroactivas presentes na fase móvel leva a menores correntes de fundo do detector e menor ruído, maximizando, deste modo, a sensibilidade do detector. Os potenciais do detector coulométrico foram estabelecidos do seguinte modo: E_1 : -75 mV; E_2 : +450 mV; *Guard Cell*: +500 mV.

A coluna usada no presente trabalho experimental foi uma coluna Waters Spherisorb ODS2 (ODS - octadecilsilano, C18), com diâmetro de partícula de 5 μm e dimensão de 4,6x250 mm. Esta coluna foi utilizada em fase reversa (situação em que a fase estacionária é menos polar do que o solvente).

3.2.2 Fase móvel

Tal como sucedeu para a selecção do sistema cromatográfico e da coluna, a selecção da fase móvel no presente trabalho experimental teve como base estudos prévios desenvolvidos no Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (188).

A fase móvel utilizada neste estudo consistiu na mistura de duas soluções, uma aquosa (solução A) e uma orgânica (solução B):

- Solução A: Solução de ácido cítrico monohidratado 50 mM (MERCK) e ácido 1-octanossulfónico 0,46 mM (SIGMA). Após a preparação da solução aquosa procedeu-se ao acerto do pH a 3,0 com NaOH 10 M. Esta fase aquosa foi, antes de efectuada a mistura com a fase orgânica, filtrada sob vácuo através de filtros de membrana de nitrato de celulose com um diâmetro de poro de 0,45 µm (ALBET). Esta solução foi utilizada numa percentagem que variou entre 90-98%, conforme os aductos em estudo e as condições do ensaio.
- Solução B: metanol de grau de pureza adequado à sua utilização em HPLC (MERCK), numa percentagem que variou entre 2-10%, de acordo com os aductos das diferentes catecolaminas em estudo e com as condições do ensaio.

Após a preparação, em separado, das soluções A e B procedeu-se à sua mistura nas proporções adequadas à catecolamina em análise. Após a mistura das soluções, e antes da sua utilização, procedeu-se à remoção de gases em corrente de hélio durante 10 minutos. Adicionalmente, esta remoção de gases da fase móvel foi continuamente efectuada pelo sistema de vácuo do HPLC.

Para o estudo das proporções ideais das soluções A e B na fase móvel, foram injectadas (20 µL) no sistema de HPLC misturas reaccionais contendo cada uma das catecolaminas, adrenalina (TP + ADR 20 µM + GSH 0,5 mM + TIR), noradrenalina (TP + NA 20 µM + GSH 0,5 mM + TIR) e dopamina (TP + DA 20 µM + GSH 0,5 mM + TIR), fazendo variar as referidas proporções. O estudo efectuado para cada catecolamina decorreu no mesmo dia, com o cuidado de

aguardar a estabilização do equipamento quando se procedia à mudança da fase móvel.

3.3. Caracterização dos aductos das catecolaminas com a GSH

3.3.1 Análise por espectrometria de UV/VIS

A espectrometria de UV/Vis foi utilizada para caracterizar os máximos de absorvância dos aductos detectados nos cromatogramas, e que são característicos deste tipo de compostos. Para o efeito, efectuaram-se misturas reaccionais de cada catecolamina (ADR, NA e DA) com a GSH (TP + catecolamina 0,5 ou 0,1 mM + GSH 0,5 mM + TIR). Uma vez interrompida a reacção entre a catecolamina e a GSH (pela adição de PCA a 15%) procedeu-se à injeção de 20 µL de cada mistura reaccional no equipamento de HPLC, o que permitiu, recorrendo ao detector de fotodíodos, a obtenção dos espectros de UV de cada pico identificado no cromatograma.

3.3.2 Análise por espectrometria de massa

Para a caracterização dos aductos por espectrometria de massa, foi acoplado ao sistema de HPLC um espectrómetro de massa Q-TOF 2 (Micromass) no qual a ionização foi efectuada por *electrospray* e o analisador recorreu à análise de tempos de voo (TOF, *time of fly*). Os espectros de *electrospray* (ESI/MS) e os espectros de massa em série (ESI/MS/MS - *tandem mass spectra*) foram, deste modo, obtidos. A resolução do instrumento foi fixada a 9500 (50% vale do pico). A voltagem da agulha capilar foi de 3000 V e a temperatura da fonte foi mantida a 150 °C. O azoto foi utilizado como gás de nebulização e o árgon usado como gás de colisão. A voltagem do cone foi fixa a 30 V para o ESI-MS e ESI-MS/MS. Os espectros de decomposição de massa induzidos por colisão foram adquiridos seleccionando o ião desejado com a secção do quadrupólo do

espectrómetro de massa e colidindo-o na cela de colisão usando uma energia de colisão de 20–25 eV. Os produtos resultantes dessa colisão foram posteriormente determinados por um analisador de TOF.

Para a referida caracterização por espectrometria de massa, procedeu-se à síntese de uma mistura reaccional contendo aductos da adrenalina com a GSH, sendo as concentrações finais destes dois compostos de 0,5 mM (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR). A mistura reaccional foi injectada no HPLC (20 µL) utilizando uma fase móvel adequada à detecção por espectrometria de massa constituída por acetato de amónio 10 mM e metanol (3%). O espectrómetro de massa acoplado ao HPLC permitiu a obtenção dos espectros de ESI/MS e ESI/MS/MS dos picos identificados no cromatograma obtido por HPLC com detecção de fotodíodos.

3.3.3 Aducto 5-(glutation-S-il)adrenalina purificado

Outro processo de caracterização dos aductos das catecolaminas com a GSH envolveu a síntese e purificação do aducto 5-(glutation-S-il)-adrenalina pelo Departamento Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Lisboa. Para o efeito, após a síntese, foi preparada uma solução deste composto em PCA a 5%. Simultaneamente, foi efectuada a mistura reaccional TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR. As duas amostras (solução padrão e mistura reaccional) foram, posteriormente, injectadas no sistema de HPLC (20 µL) nas mesmas condições cromatográficas e efectuada a análise comparativa dos cromatogramas obtidos por detecção electroquímica.

3.4. Processo de extracção pela alumina dos aductos das catecolaminas com a GSH em amostras biológicas

O processo de extracção utilizado no âmbito deste trabalho experimental foi baseado no procedimento adoptado por diversos autores para a extracção das catecolaminas pela alumina (214-222).

O protocolo para a extracção dos aductos das catecolaminas pela adsorção na alumina encontra-se esquematizado na ~~Figura 3.2~~~~Figura 3.2~~, e resultou de diversos estudos efectuados conduzidos de forma a adaptar o procedimento inicial definido para a extracção das catecolaminas à extracção dos correspondentes aductos com a glutatona. Descreve-se, de seguida, os diferentes passos do processo de extracção de forma pormenorizada:

- Adicionar a tubos cónicos de 15 mL:
 - 50 mg de alumina (Al_2O_3) lavada e activada [Merck: óxido de alumínio, 90% activa, neutra, PM=101,94 g/mol]
 - 750 μL de amostra
 - Tampão Tris/EDTA (1,5 M / 15 mM; pH 8.6) até pH 8,3-8,6 [Sigma Trizma base PM=121,14 g/mol; Merck Titriplex* III (ácido etilenodinitrilotetracético, sal dissódico dihidrato, PM=362,24 g/mol)].
- Rolhar e agitar em vortex os tubos cónicos;
- Agitar, num agitador (GFL modelo 3006), durante 15 minutos à temperatura ambiente e com uma frequência de agitação de 300 min^{-1} ;
- Inclinar os tubos cónicos de forma a molhar o interior da tampa e retirar restos de alumina;
- Deixar a alumina repousar, aspirar o sobrenadante e rejeitar;
- Colocar 1 mL de água bidestilada fria (mantida a 4°C), agitar em vortex, deixar repousar e aspirar novamente o sobrenadante (lavagem da alumina para eliminar os compostos não adsorvidos);
- Repetir a lavagem e no final adicionar 500 μL de água bidestilada fria;
- Transferir o conteúdo dos tubos cónicos para *eppendorfs* com filtro (Costar Spin-X 8169 0,2 μm nylon filter) e centrifugar a 4000 rpm durante 2 minutos a 4°C ;

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

- Colocar o filtro com a alumina num novo *ependorf* e adicionar 300 μL de PCA a 5%;
- Agitar em vortex, aguardar 5 minutos, agitar novamente e centrifugar a 4000 rpm durante 2 minutos a 4 °C (no final, verificar se a centrifugação foi suficiente para que o volume de PCA se encontre no fundo *ependorf* e a alumina no filtro);
- Injectar uma alíquota do extracto (20 μL) no equipamento de HPLC.

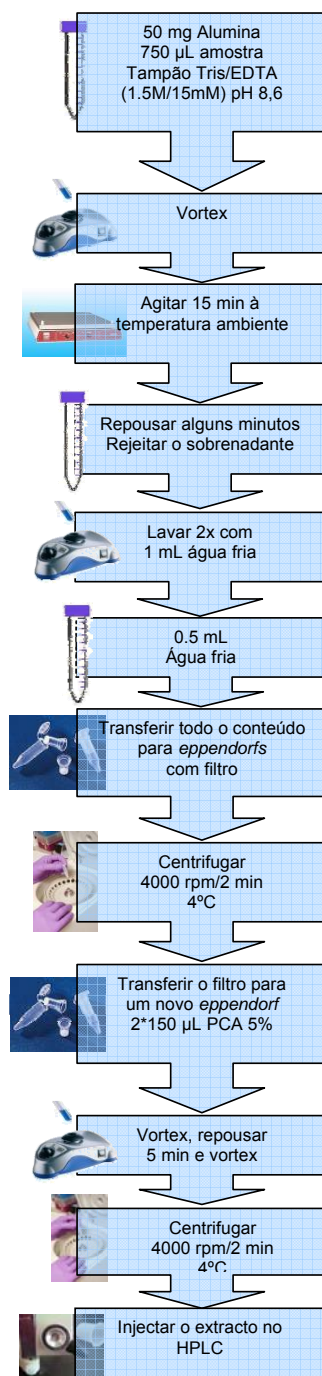


Figura 3.2 - Protocolo experimental adaptado para extracção, pela alumina, de aductos das catecolaminas com a GSH.

3.5. Tratamento de dados

Para o registo e processamento de dados foi utilizado um computador Compaq equipado com o software Millenium³² (Waters). Este software permitiu o processamento dos dados cromatográficos, tornando possível a integração das áreas dos picos cromatográficos. No que respeita à representação dos cromatogramas, os dados cromatográficos foram exportados para o software Microsoft Office Excell 2003, procedendo-se à análise gráfica recorrendo a gráficos de dispersão.

Nos estudos realizados com o detector coulométrico procedeu-se à monitorização diária das condições experimentais, nomeadamente da sensibilidade do detector e do tempo de retenção dos compostos na coluna. Para o efeito, recorreu-se à utilização de amostras controlo que consistiram numa mistura reaccional que foi injectada ao longo do dia e em diferentes dias, para detectar eventuais alterações nos tempos de retenção dos compostos e na sensibilidade do detector. Deste modo, todos os resultados apresentados no âmbito da presente dissertação foram expressos tendo em conta eventuais correcções devidas a alterações da sensibilidade do detector, alterações essas detectadas através do aparecimento de diferenças nas áreas dos picos dos cromatogramas correspondentes às amostras controlo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. FASE I - Síntese dos aductos das catecolaminas com a GSH e optimização das condições cromatográficas para a sua detecção

Tal como anteriormente referido, os aductos das catecolaminas com a GSH não se encontram disponíveis comercialmente tendo sido, por isso, necessário proceder à sua síntese no laboratório. A conjugação das catecolaminas com a GSH ocorre após a oxidação das catecolaminas, tal como descrito na [Figura 1.10](#).

A oxidação das catecolaminas pode ocorrer por um fenómeno de autooxidação. Contudo, a pH fisiológico, esta reacção é extremamente lenta e tem, por isso, pouca relevância fisiológica (43, 50, 59, 223). De maior relevância fisiológica é a oxidação das catecolaminas catalisada por enzimas, metais de transição e/ou por espécies radicalares (46, 50, 60, 62, 66, 223-225). Deste modo, no âmbito da síntese destes aductos no laboratório, tentaram criar-se condições experimentais semelhantes às fisiológicas, ou seja, pH fisiológico e um sistema enzimático (tirosinase) capaz de catalisar a oxidação das catecolaminas.

A tirosinase pertence a uma grande família de proteínas capazes de ligar o oxigénio molecular e que estão amplamente distribuídas nos organismos vivos (226). Esta família de proteínas que contém cobre inclui as hemocianinas, que funcionam como transportadores de oxigénio na hemolinfa de artrópodes e crustáceos, e uma grande variedade de polifenoloxidasas que podem oxidar catecóis e/ou fenóis (226). O termo tirosinase, especificamente, refere-se às enzimas capazes de oxidar quer fenóis quer catecóis a *orto*-quinonas (226, 227). A tirosinase é uma enzima chave na síntese de melanina na pele e cabelos, tendo, igualmente, sido considerada como interveniente na formação de neuromelanina (227). De facto, segundo Land *et al.* (2003), a tirosinase oxida a tirosina a dopaquinona, a qual sofre reacções não enzimáticas dando origem a precursores dos pigmentos de melanina (226).

Deste modo, a tirosinase utilizada no presente trabalho experimental apresenta a capacidade de oxidar as catecolaminas presentes na mistura reaccional originando as correspondentes *o*-quinonas. Estes compostos

resultantes são, como referido na introdução, extremamente reactivos e apresentam afinidade para o grupo sulfidrilo da glutatona presente no meio reaccional, com a consequente formação dos aductos correspondentes.

O protocolo de base que permitiu as adaptações necessárias aos objectivos deste estudo, quer ao nível da síntese dos aductos, quer ao nível das condições cromatográficas para a detecção destes compostos, baseou-se em estudos prévios desenvolvidos no Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (188). Nesses estudos, foram identificados os conjugados entre os metabolitos catecóis da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, “ecstasy”) e a GSH produzidos em hepatócitos isolados de rato. Para o efeito, após precipitação em meio ácido da suspensão celular e posterior centrifugação, o sobrenadante foi injectado directamente no mesmo sistema cromatográfico HPLC Waters modelo 2690 equipado com 2 detectores em série, um detector de fotódiodos (Waters 996 Photodiode Array detector) e um detector electroquímico (detector coulométrico ESA Coulochem II). Nesses estudos, a utilização de HPLC em fase reversa com recurso à coluna Waters Spherisorb 5 µm ODS2 4,6x250 mm revelou-se adequada à identificação dos referidos conjugados entre os metabolitos catecóis da MDMA e a GSH. A coluna, onde ocorre o processo de separação, constitui-se como um factor crítico do processo de separação cromatográfica por HPLC. O sucesso de uma análise depende em grande parte da correcta escolha da coluna e das condições em que a mesma é operada. As colunas Waters Spherisorb são uma das marcas comerciais de colunas de enchimento para HPLC mais utilizadas, fornecendo uma vasta gama de métodos validados e aplicações que auxiliam no processo de desenvolvimento de um método. Uma das grandes vantagens da escolha das colunas Waters Spherisorb é a grande diversidade de opções disponíveis. Estas colunas são produzidas numa vasta gama de tamanhos e de tipos de enchimento para ir de encontro às necessidades do operador. A sílica é produzida em partículas de tamanho igual a 3, 5 ou 10 µm e a elevada qualidade das fases de enchimento permite muitas selectividades de separação diferentes e únicas.

Outros parâmetros metodológicos ao nível das condições cromatográficas para a detecção destes compostos basearam-se, igualmente, nas condições

descritas por Carvalho *et al.* (2004), nomeadamente a fase móvel e os potenciais electroquímicos. Deste modo, nesses estudos, a fase móvel foi utilizada em modo isocrático com fluxo de 1 mL/min sendo constituída por ácido cítrico 50 mM, ácido 1-octanesulfónico 0,46 mM, com 15% metanol e pH ajustado a 3,0 (188). Adicionalmente, os potenciais electroquímicos do detector coulométrico foram estabelecidos do seguinte modo E_1 (*screening*): -100 mV; E_2 (analítico): +350 mV; *Guard Cell*: +450 mV. A detecção electroquímica foi definida para o eléctrodo 2 com uma corrente que variou entre 1 e 5 μ A (188).

4.1.1 Influência da percentagem de metanol na fase móvel na resolução cromatográfica dos aductos

A fase móvel é um dos parâmetros mais importantes em HPLC, uma vez que a sua composição é uma das variáveis que mais influencia a separação cromatográfica. O tipo de fase móvel usado pode ter um acentuado efeito na retenção dos compostos e pode promover ou suprimir a ionização do(s) analito(s).

A fase móvel utilizada no presente trabalho consistiu na mistura de um solvente orgânico e um aquoso, cujas proporções foram ajustadas de forma a otimizar o processo de separação. Para cada catecolamina estudada, procedeu-se ao ajuste da percentagem de metanol no sentido de avaliar o efeito do solvente orgânico no processo de separação, reflectindo-se essa alteração na obtenção de cromatogramas com boa definição, separação e resolução dos picos cromatográficos, num período de tempo útil.

Em primeiro lugar, estabeleceu-se a percentagem de metanol que permitiu uma melhor separação dos compostos formados numa mistura reaccional contendo adrenalina e GSH. A mistura reaccional TP + ADR 20 μ M + GSH 0,5 mM + TIR foi injectada (20 μ L) no sistema de HPLC com 3, 4 e 5% de metanol na fase móvel.. Os potenciais do detector coulométrico foram: E_1 (*screening*): -100 mV; E_2 (analítico): +350 mV; *Guard Cell*: +450 mV. Deste modo, por detecção electroquímica, obtiveram-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.1](#)
4.1.

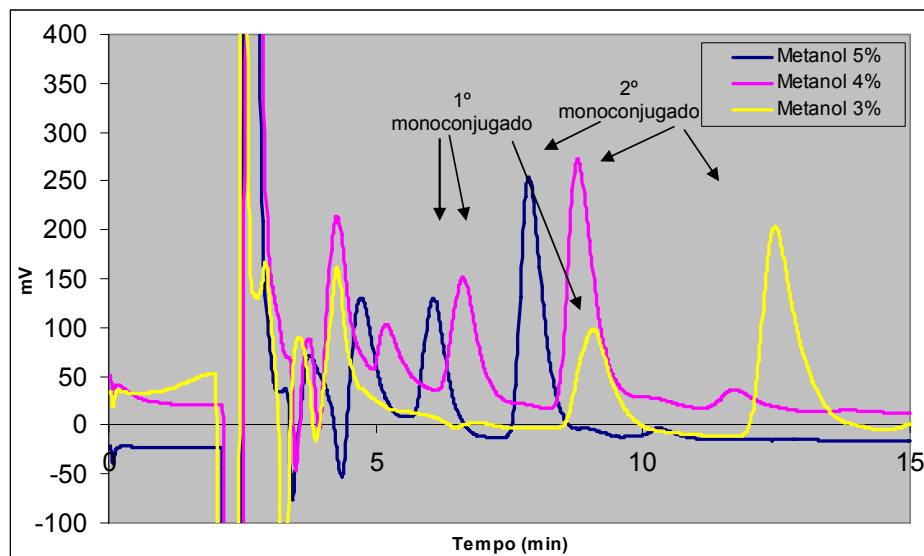


Figura 4.1- Influência da percentagem de metanol na fase móvel na separação cromatográfica dos compostos presentes numa mistura reaccional contendo adrenalina (TP + ADR 20 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).

Pela análise da [Figura 4.1](#) foi possível verificar que as três condições testadas permitiram uma perfeita separação dos compostos presentes na amostra. Contudo, a percentagem de metanol que permitiu a melhor separação dos compostos presentes num período de tempo aceitável para a obtenção do cromatograma foi, nas condições em que foi efectuado o ensaio, a percentagem de 3% de metanol.

O estudo da influência da percentagem de solvente orgânico na fase móvel foi, igualmente, efectuado para a detecção dos aductos da noradrenalina (TP + NA 20 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e da dopamina (TP + DA 20 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) com a GSH. Após a injeção destas misturas reaccionais (20 μ L) em condições de diferentes percentagens de metanol (2, 4, e 5% para a noradrenalina e 7 e 10% para a dopamina) obtiveram-se, por detecção electroquímica, os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.2](#).

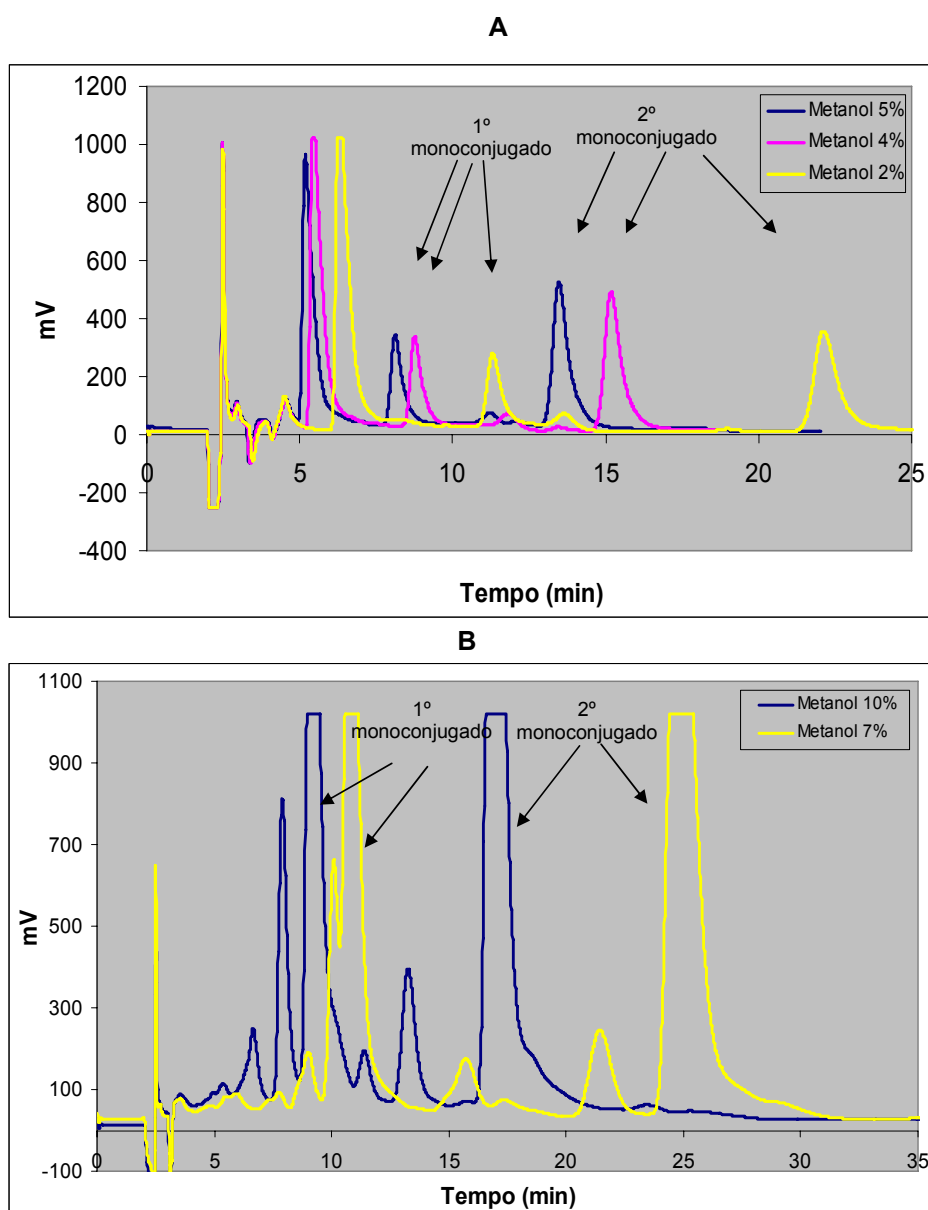


Figura 4.2 Influência da percentagem de metanol na fase móvel na separação cromatográfica dos compostos presentes numa mistura reaccional contendo noradrenalina (A) (TP + NA 20 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) ou dopamina (B) (TP + DA 20 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).

Pela análise da [Figura 4.2](#) foi possível constatar que, na selecção da percentagem de metanol da fase móvel, é necessário estabelecer o

compromisso entre a separação dos compostos presentes na amostra e um período de tempo útil para a obtenção do cromatograma. Deste modo, nas condições em que este ensaio foi efectuado, a utilização de 2 e 7% de metanol na separação de misturas reaccionais contendo noradrenalina e dopamina, respectivamente, revelou-se inadequada, dado o elevado período de tempo necessário à separação dos compostos. Relativamente à mistura reaccional contendo NA, a utilização de 4 ou 5% de metanol permitiu a obtenção de cromatogramas idênticos. No que diz respeito à mistura reaccional contendo DA, a utilização de 10% de metanol na fase móvel permitiu obter uma boa separação e resolução dos picos presentes no cromatograma.

Estes resultados permitiram comprovar que o metanol influencia acentuadamente os tempos de retenção e a separação cromatográfica dos picos dos aductos das catecolaminas com a GSH. Deste modo, o aumento da percentagem deste solvente orgânico na fase móvel provoca a diminuição dos tempos de retenção dos compostos presentes na amostra. Por outro lado, dependendo das condições do ensaio, como por exemplo, a temperatura ambiente e o desempenho da coluna cromatográfica (tempo de vida e grau de saturação), é necessário efectuar a reavaliação da percentagem de metanol que compõe a fase móvel, uma vez que pequenas variações dessa percentagem influenciam grandemente a separação. Ao longo do trabalho foi por isso efectuado, de forma rotineira, o contínuo ajuste da percentagem de metanol na fase móvel, de forma a garantir a obtenção de cromatogramas com uma adequada resolução cromatográfica num período de tempo útil.

4.1.2 Selecção das condições de detecção electroquímica

O detector constitui-se como a parte do cromatógrafo que responde à presença de solutos na fase móvel e que mede a quantidade de um componente da amostra no efluente da coluna. Os detectores de elevada qualidade exibem elevada sensibilidade, baixo ruído, uma vasta gama de resposta linear e respondem a todos os tipos de compostos. Por conseguinte, são dispositivos

usados para detecção em métodos cromatográficos e baseiam-se em diferenças nas propriedades químicas e físicas do eluente e do(s) analito(s).

Os detectores usados no presente trabalho experimental foram, como já referido, seleccionados de acordo com estudos prévios realizados no Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto para a quantificação, em suspensões de hepatócitos isolados, dos conjugados entre os metabolitos catecóis da MDMA e a GSH (188). Em alguns dos estudos efectuados foi usado mais do que um tipo de detecção, pelo que se ligaram os detectores em série ao sistema de HPLC.

A detecção electroquímica foi, tal como referido em 3.2.1, uma das metodologias utilizadas, e envolveu o uso de um potencial eléctrico para provocar uma reacção electroquímica, sendo esse potencial aplicado característico do composto de interesse. Este tipo de detecção é extremamente selectivo e, consequentemente, é útil para a determinação de componentes conhecidos de misturas complexas. A corrente que é medida numa reacção electroquímica é proporcional à concentração das espécies (composto, ião ou elemento) que estão a ser oxidadas ou reduzidas. Num detector electroquímico, o eluente passa através de uma célula que fornece os potenciais apropriados e monitoriza a corrente. Existem duas aproximações à detecção electroquímica por HPLC, a detecção amperométrica e a detecção coulométrica, sendo esta última a utilizada no presente trabalho experimental. Neste tipo de células, o eluente flui através do eléctrodo e praticamente a totalidade do composto de interesse é oxidada (ou reduzida), permitindo uma maior sensibilidade. Deste modo, com este tipo de detecção, aproximadamente 100% das espécies de interesse é oxidada (ou reduzida) e o sinal observado é directamente proporcional à concentração das espécies relevantes. Uma vez que a fase móvel flui através da célula, é incorporado um filtro para garantir que não entra material particulado na célula electroquímica.

Relativamente ao detector electroquímico tornou-se imperativo o estabelecimento das suas condições de trabalho, nomeadamente os valores dos potenciais dos dois eléctrodos e do potencial da *Guard Cell*. A selecção dos parâmetros analíticos adequados para uma dada metodologia torna-se crítica na

maximização do desempenho de um detector. Um desses parâmetros está relacionado com a obtenção do potencial apropriado para efectuar a análise, parâmetro esse que se constitui como o potencial que fornece o maior sinal da oxidação (ou redução) de um analito, enquanto minimiza o sinal das interferências (isto é, compostos electroactivos que co-eluem com os compostos de interesse ou que estão presentes na fase móvel). Deste modo, foi necessário obter um voltamograma para definir os potenciais de trabalho.

A voltametria é uma das técnicas electroanalíticas mais versáteis para o estudo de espécies de electroactivas. O voltamograma corresponde, neste caso, a um gráfico de área do pico em função do potencial que é aplicado ao(s) eléctrodo(s) e que varia em intervalos pré-definidos. A área do pico registada é proporcional à concentração da espécie que se oxida (ou se reduz) para um dado valor de potencial. A selecção do potencial com o qual se obtém a máxima área do pico permite, deste modo, aumentar a sensibilidade do processo de detecção.

Existem dois tipos de voltametria que podem ser utilizados na determinação do potencial óptimo para análise: hidrodinâmica e cíclica. O primeiro tipo foi o utilizado no âmbito do presente trabalho experimental, segundo o qual o potencial aplicado é inicialmente mantido constante sendo, posteriormente, injectada, no HPLC, uma amostra de concentração constante. A área do(s) pico(s) de interesse registada no cromatograma é determinada e, subsequentemente, alterado o valor do potencial por forma a proceder a uma nova injeção da mesma amostra. De salientar que, após a alteração do valor do potencial, é necessário esperar que o eléctrodo atinja o equilíbrio antes de proceder à injeção seguinte. Um gráfico da área do pico em função do potencial para cada composto é, então, manualmente gerado para determinar o potencial óptimo de oxidação (redução) do analito de interesse.

Na determinação do potencial óptimo para a detecção de aductos de catecolaminas com a GSH procedeu-se a injeção (20 μ L) de uma mistura de reacção em tampão cujas concentrações eram as seguintes: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR. O valor do potencial E_1 foi fixado a -75 mV, variando o potencial de E_2 de +100 a +500 mV (+100, +200, +300, +350, +400, +450 e +500 mV). O valor do potencial da *guard cell* foi fixado a +500mV, excepto na situação

em que o E_2 foi de +500 mV. Neste caso, usou-se um potencial da *guard cell* de +550 mV para manter o valor de potencial da *guard cell* sempre superior ao potencial E_2 . Procedeu-se, de seguida, à determinação das áreas obtidas para cada pico correspondente aos dois compostos detectados (que, verificou tratar-se de monoconjugados da adrenalina com a GSH, ver Figura 4.5), as quais se encontram representadas na ~~Tabela 4.1~~~~Tabela 4.1~~, para cada valor de potencial aplicado ao eléctrodo 2 da célula electroquímica.

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Tabela 4.1 - Áreas dos picos correspondentes aos dois compostos detectados (monoconjugados da adrenalina com a GSH) para cada valor de E_2 testado (amostra injectada no sistema de HPLC-ED: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).

E_2 (mV)	Área do 1º Monoconjugado	Área do 2º Monoconjugado
+100	0,00E+00	6,97E+03
+200	2,69E+04	3,32E+05
+250	9,41E+04	6,62E+05
+300	1,84E+05	1,32E+06
+350	4,11E+05	1,89E+06
+400	6,38E+05	2,17E+06
+450	8,20E+05	2,33E+06
+500	9,65E+05	2,37E+06

Após a integração das áreas dos picos correspondentes aos cromatogramas obtidos para cada valor de potencial, procedeu-se à representação gráfica da área dos picos em função do valor do potencial aplicado ao eléctrodo 2 (voltamograma hidrodinâmico), tal como ilustrado na ~~Figura 4.3~~~~Figura 4.3~~.

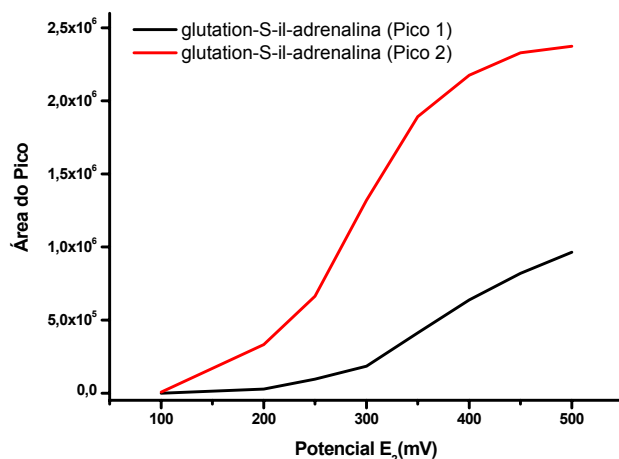


Figura 4.3 - Voltamogramas hidrodinâmicos dos monoconjugados da adrenalina com a GSH (amostra injectada no sistema de HPLC-ED: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).

Pela análise dos voltamogramas hidrodinâmicos obtidos (~~Figura 4.3~~~~Figura 4.3~~) verificou-se que a área dos picos (resultante da transformação do sinal de corrente medido pelo detector) aumenta à medida que aumenta o valor de E_2 . Isto significa que é necessário aplicar um maior potencial para que ocorra a oxidação (ou redução) total dos compostos que se pretende determinar. Pela análise do voltamograma correspondente ao 2º monoconjugado (voltamograma a vermelho, ~~Figura 4.3~~~~Figura 4.3~~) foi possível constatar que não existem diferenças significativas entre os valores de área obtidos nos potenciais +450 e +500 mV. Desta forma, e dado que o 2º pico do cromatograma corresponde ao aducto que se forma em maior extensão (e, conseqüentemente, com maior probabilidade de ser detectado *in vivo*), optou-se por definir este potencial de E_2 como o potencial óptimo de trabalho a utilizar na detecção de aductos das catecolaminas com a GSH. Desta forma, não existe a necessidade de sobrecarregar o eléctrodo com valores de potencial mais elevados, dada a semelhança entre os valores de área obtidos nas últimas condições de potencial estabelecidas.

Em conclusão, após a realização do estudo relativo à selecção do potencial óptimo de análise foram definidas as seguintes condições de trabalho:

- *Guard cell*: +500 mV

- Eléctrodo 1: -75 mV
- Eléctrodo 2: +450 mV

4.2. FASE II - Caracterização dos aductos das catecolaminas com a GSH

A caracterização dos aductos das catecolaminas com a glutatona foi efectuada mediante:

- Análise dos espectros de UV/VIS obtidos após injeção, no HPLC com detector de fotodíodos, das misturas reaccionais contendo os aductos. Após análise dos máximos de absorvância dos compostos que eluíam da coluna, identificaram-se os picos cujos máximos de absorvância correspondiam aos descritos na literatura para os aductos das catecolaminas com a GSH.
- Análise dos espectros de massa obtidos após injeção, no HPLC acoplado a um espectrómetro de massa, de uma mistura reaccional contendo os aductos da ADR com a GSH.
- Análise comparativa dos cromatogramas (obtidos por detecção electroquímica) resultantes da injeção de uma mistura reaccional contendo aductos da ADR com a GSH e de uma solução padrão do monoconjugado 5-(glutation-S-il)-adrenalina, sintetizado no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Lisboa. Esta análise permitiu a confirmação da identidade e tempo de retenção deste aducto nas condições cromatográficas testadas.

Foram, também, efectuadas diversas tentativas no sentido de caracterizar estes compostos através do seu espectro de RMN. Com este objectivo, procedeu-se à recolha das fracções de cada um dos picos que eluíam da coluna, num total de 20 injeções de 100 µL de amostra (as concentrações finais de ADR e GSH na mistura de reacção foram de 0,5 mM). Após a recolha de cada um dos 3 picos que eluíam da coluna (dois monoconjugados e 1 biconjugado) procedeu-se à concentração e purificação destas amostras pela técnica de extracção pela alumina. Estas soluções isoladas foram, posteriormente, liofilizadas para serem

analisadas por RMN no Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra. Contudo, os procedimentos adoptados na preparação das amostras alteraram a estabilidade dos compostos, impossibilitando até ao momento a referida análise. Estão, no entanto, a efectuar-se estudos no sentido de optimizar o processo para a futura análise por RMN.

4.2.1 Análise por espectrometria de UV/VIS

O primeiro método utilizado no âmbito da caracterização dos aductos das catecolaminas com a GSH foi a espectrofotometria de UV/VIS. A detecção da absorvância dos analitos no ultravioleta-visível é das mais amplamente utilizadas em HPLC. A base da detecção UV/VIS é a diferença na absorção da luz pelo analito e pelo eluente, isto é, é detectada a diferença na quantidade de luz absorvida por um analito que atinge o detector relativamente à quantidade de luz absorvida pelo eluente, num determinado comprimento de onda.

Para o efeito, acoplado ao equipamento de HPLC encontrava-se um detector UV/VIS (detector de fotodíodos) o qual permitiu a obtenção dos espectros de absorvância de cada pico detectado. Deste modo, procedeu-se à preparação de diferentes misturas reaccionais com as diferentes catecolaminas (TP + ADR 0,1 mM + GSH 0,5 mM + TIR; TP + NA 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR e TP + DA 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR). Foram utilizadas elevadas concentrações de catecolaminas nas misturas reaccionais de forma a facilitar a obtenção dos espectros, dada a menor sensibilidade deste tipo de detectores relativamente aos detectores electroquímicos.

O primeiro estudo efectuado utilizou a ADR como catecolamina interveniente na reacção. Após a injeção de 20 µL da mistura reaccional no sistema de HPLC-DAD (cromatografia líquida de alta resolução com detecção por fotodíodos) foi possível obter o cromatograma ilustrado na Figura 4.4.

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

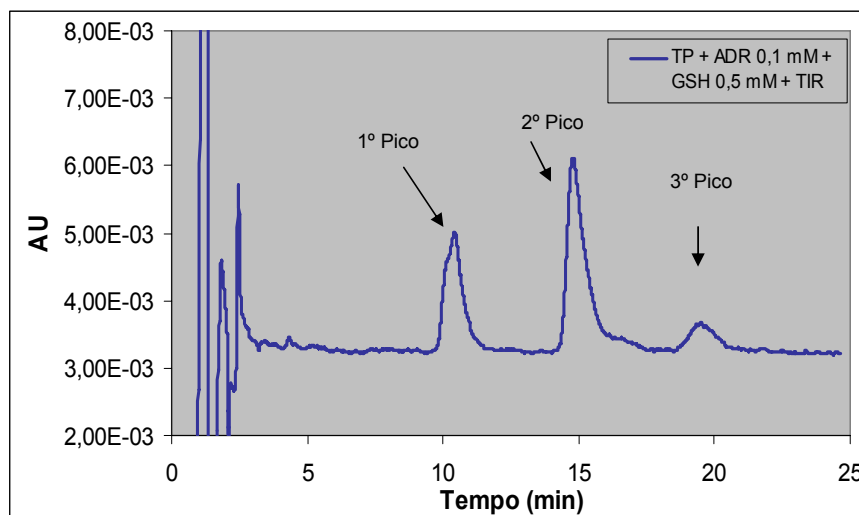


Figura 4.4 - Cromatograma obtido, por detecção de fotodíodos, após injeção de 20 μ L de uma mistura de reacção com adrenalina 0,1 mM (TP + ADR 0,1 mM + GSH 0,5 mM + TIR).

Pela análise do cromatograma obtido foi possível constatar a presença de 3 picos com tempos de retenção de 10,5; 14,9 e 19,6 minutos. Procedeu-se, de seguida, à análise dos respectivos espectros, os quais se encontram ilustrados na [Figura 4.5](#).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

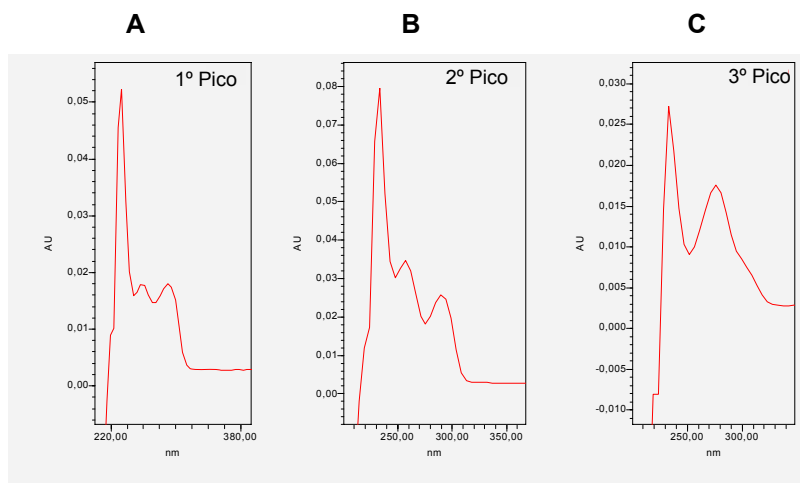


Figura 4.5 - Espectros de absorvância obtidos para os três picos detectados após injeção de uma mistura reaccional com uma concentração de 0,1 mM de adrenalina (TP + ADR 0,1 mM + GSH 0,5 mM + TIR).

Deste modo, verificou-se que os dois primeiros picos apresentaram espectros de absorvância idênticos, com máximos de absorvância nos comprimentos de onda de 256 e 292 nm, os quais são característicos de monoconjugados das catecolaminas com a GSH (116, 188, 213, 228). Os resultados obtidos são concordantes com os obtidos por Spencer *et al.* (1998), num estudo em que se procedeu à síntese de aductos das catecolaminas (DA, DOPA e DOPCA) com a GSH, cuja ligação do grupo sulfidrílo se efectuava na posição 5 do anel catecol (5-glutation-S-il-catecolamina). Os espectros de absorvância obtidos para os monoconjugados sintetizados no referido estudo apresentaram máximos de absorvância a 256 e 291 nm, tal como sucedeu com os espectros obtidos no âmbito do presente estudo (116). Os resultados obtidos foram, igualmente, coincidentes com os obtidos por Carvalho *et al.* (2004), num estudo em que se procedeu à síntese de aductos do metabolito catecol da MDMA, a α -MeDA, com a GSH. O cromatograma obtido através da injeção da mistura reaccional revelou a presença de dois picos principais, correspondentes aos monoconjugados 2-(glutation-S-il)- α -MeDA e 5-(glutation-S-il)- α -MeDA. Ainda no âmbito desse estudo procedeu-se à incubação de hepatócitos isolados de rato com α -MeDA. A caracterização do aducto 5-(glutation-S-il)- α -MeDA, formado após a referida incubação, foi possível mediante a comparação do espectro UV do pico obtido pela injeção da amostra com o espectro UV do pico de um padrão de 5-(glutation-S-il)- α -MeDA (188). Adicionalmente, o mesmo espectro foi, igualmente, observado para o conjugado sintetizado 2-(glutation-S-il)- α -MeDA. Os espectros de absorvância obtidos foram idênticos, apresentando máximos de absorvância a 256 e 292 nm (188). Por último, a corroborar os resultados obtidos no âmbito do presente estudo estão os resultados obtidos por Zhang *et al.* (1995) num estudo em que se procedeu à síntese do aductos 5-glutation-S-il-dopamina, cujo espectro apresentou máximos de absorvância a 256 e 294 nm (228).

A análise do espectro do terceiro pico revelou máximos de absorvância a 233 e 277 nm, característicos de biconjugados de compostos catecóis com a GSH (164). O espectro obtido para o biconjugado foi idêntico ao obtido por Miller *et al.* (1997) para o biconjugado da α -MeDA com a GSH. Nesse estudo, procedeu-se à síntese do aducto 2,5-bis-(glutation-S-il)- α -MeDA o qual, após purificação e

concentração, foi caracterizado por HPLC com detector de fotodíodos, exibindo um espectro com máximos de absorvância a 302, 275 e 275 nm (164). Deste modo, pela análise dos espectros obtidos, verificou-se que os principais produtos resultantes da reacção da ADR com a GSH correspondem a dois monoconjugados e um biconjugado.

O presente estudo de caracterização foi, igualmente, efectuado para uma mistura reaccional contendo NA (TP + NA 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR), obtendo-se o cromatograma ilustrado na [Figura 4.6](#) ~~Figura 4.6~~.

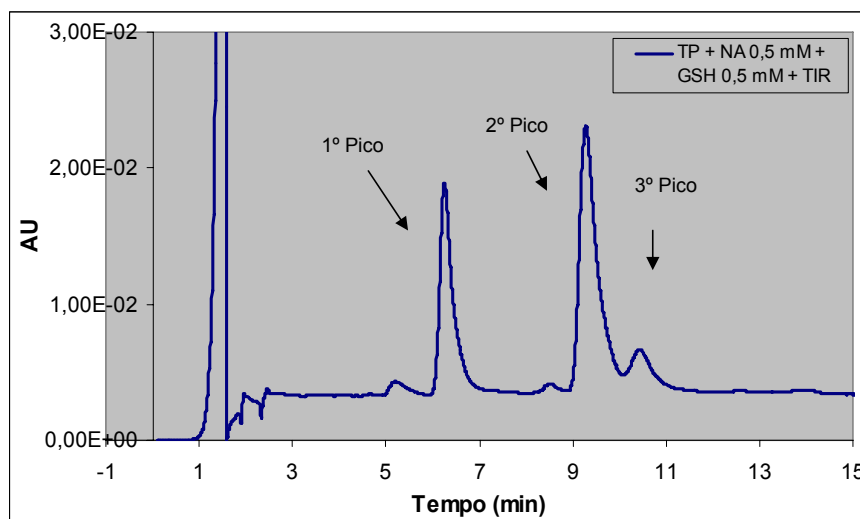


Figura 4.6 - Cromatograma obtido, por detecção UV/Vis, após injeção de 20 µL de uma mistura de reacção com noradrenalina 0,5 mM (TP + NA 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR).

Pela análise do cromatograma obtido foi possível constatar a presença de 3 picos com tempos de retenção de 6,3; 9,3 e 10,6 minutos. Procedeu-se, de seguida, à análise dos respectivos espectros, verificando-se que os dois primeiros picos apresentavam um espectro típico de monoconjugado de catecolaminas com a GSH, enquanto que o espectro do último pico correspondeu ao biconjugado ([Figura 4.7](#) ~~Figura 4.7~~).

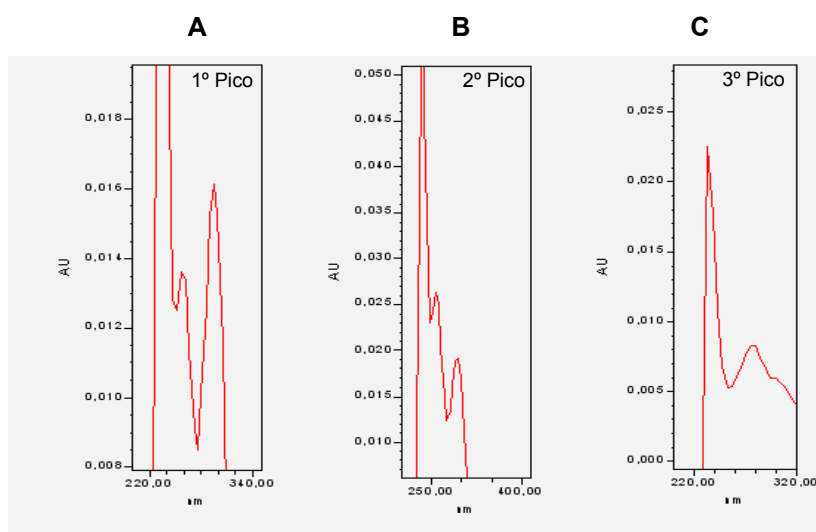


Figura 4.7 - Espectros de absorvância obtidos para os três picos detectados após injeção de uma mistura reaccional com noradrenalina 0,5 mM (TP + NA 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR).

Por último, foi efectuado o estudo de caracterização dos compostos formados numa mistura reaccional contendo DA (TP + DA 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR), obtendo-se o cromatograma ilustrado na [Figura 4.8](#).

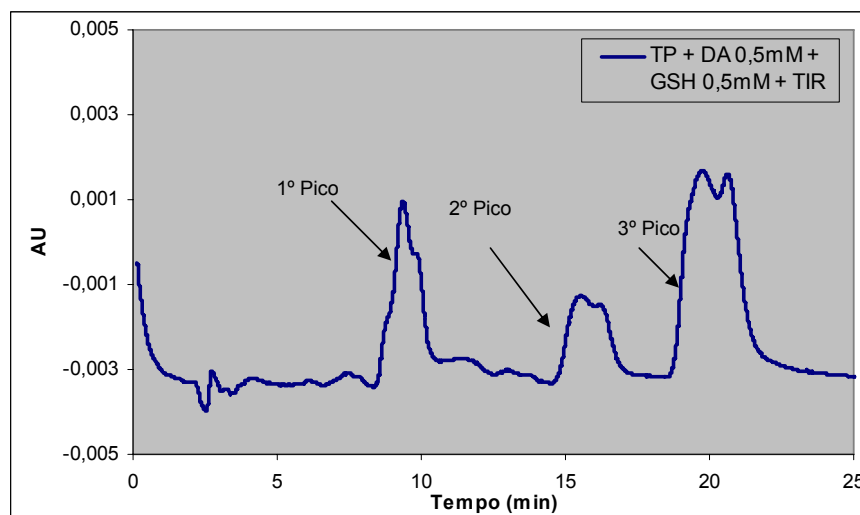


Figura 4.8 - Cromatogramas, obtidos por detecção UV/Vis após injeção de 20 μ L de uma mistura de reacção com dopamina 0,5 mM (TP + DA 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR).

Pela análise do cromatograma obtido foi possível constatar a presença de 3 picos com tempos de retenção de 9,4; 15,5 e 19,7 minutos. Procedeu-se à análise dos respectivos espectros, verificando-se que o primeiro pico apresentava um espectro típico de monoconjugado de catecolaminas com a GSH, assim como o último pico do cromatograma ([Figura 4.9](#)~~Figura 4.9~~ A e B). Foi, igualmente, possível detectar um pico com tempo de retenção de 15,5 minutos o qual, pela análise do espectro, demonstrou tratar-se de um biconjugado ([Figura 4.9](#)~~Figura 4.9~~ C). De salientar que, ao contrário das outras catecolaminas, no caso da DA, o biconjugado apresenta um tempo de retenção intermédio entre os dois monoconjugados ([Figura 4.8](#)~~Figura 4.8~~).

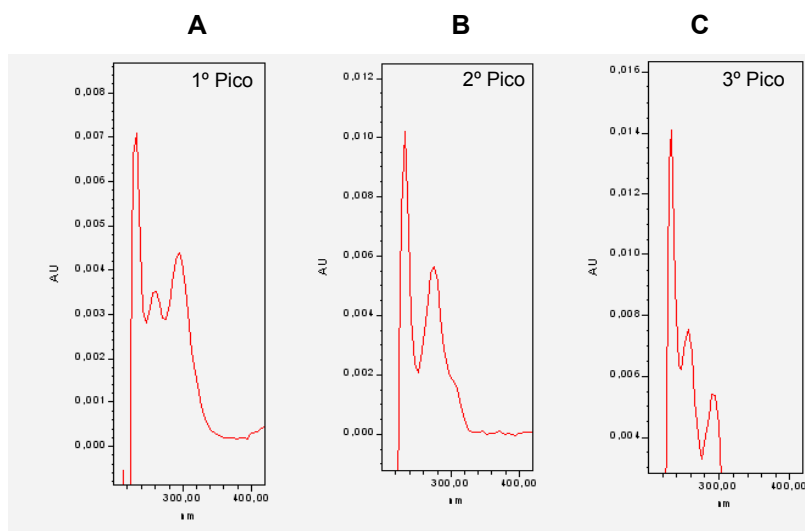


Figura 4.9 - Espectros de absorvância obtidos para os três picos detectados após injeção de uma mistura reaccional com dopamina 0,5 mM (TP + DA 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR).

Em suma, o presente trabalho permitiu a caracterização, por espectrofotometria de UV/VIS, dos produtos resultantes da reacção de conjugação das catecolaminas ADR, NA e DA com a GSH com base na análise dos espectros de UV obtidos para cada pico detectado nos cromatogramas.

4.2.2 Análise por espectrometria de massa

A espectrometria de massa permite analisar a massa molecular de um composto, bem como obter informações estruturais a partir do seu perfil de fragmentação. Deste modo, a amostra é, inicialmente, ionizada por uma determinada técnica de ionização (neste caso, *electrospray*) ocorrendo a formação do ião molecular que é, posteriormente, detectado. Esta ionização torna-se muito importante dada a mais fácil manipulação de iões, comparativamente com as moléculas neutras. Na maioria dos métodos de ionização, como é o caso do método utilizado, existe a possibilidade de criar iões da amostra carregados positiva e negativamente, dependendo da afinidade da amostra por protões. No âmbito do presente trabalho procedeu-se à detecção de iões carregados positivamente. Estes iões são extraídos na região do analisador do espectrómetro de massa, onde são separados de acordo com a razão massa (m) / carga (z) (m/z). Os iões separados são detectados e este sinal enviado a um sistema de dados, onde as razões m/z são armazenadas juntamente com a sua abundância relativa para apresentação no formato de um espectro de m/z .

As condições experimentais para os estudos de espectrometria de massa estão descritas no ponto 3.3.2. Em termos gerais, os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro Q-TOF 2, após injeção das amostras conforme descrito. O estudo de espectrometria de massa foi realizado com uma amostra contendo aductos da ADR com a GSH, resultantes da reacção entre esta catecolamina e a GSH (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR). Pretende-se, num futuro próximo, efectuar estes mesmos estudos com os aductos das restantes catecolaminas com este composto tiólico.

No início do estudo, verificou-se a impossibilidade de utilização da fase móvel de trabalho (constituída por metanol, ácido cítrico e ácido 1-octanossulfónico) nas análises por espectrometria de massa. Por conseguinte, foram efectuados estudos preliminares com uma fase móvel composta por acetato de amónio 10 mM e metanol, no sentido de averiguar quais os tempos de retenção esperados para os compostos em análise e qual a percentagem de metanol ideal para a análise. A selecção desta nova fase móvel (utilizada apenas

no presente estudo) foi baseada em estudos prévios efectuados no Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, nos quais se procedeu à determinação dos aductos 2-(glutathion-S-il)- α -MeDA e 5-(glutathion-S-il)- α -MeDA por HPLC-MS (188). O estabelecimento das proporções dos componentes desta nova fase móvel teve como principal objectivo o estabelecimento das condições que permitem a melhor separação dos picos e o conhecimento dos respectivos tempos de retenção. Para o efeito, procedeu-se à injeção no sistema de HPLC de uma mistura reaccional contendo ADR (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR), fazendo variar a percentagem de metanol na fase móvel. Estes estudos permitiram estabelecer que a percentagem mais adequada à análise é de 3% de metanol. Nestas condições, os tempos de retenção dos monoconjugados da ADR com a GSH foram de 12,6 e 18,9 minutos, respectivamente.

Este estudo de caracterização por espectrometria de massa foi possível através do acoplamento de um sistema de HPLC (idêntico ao utilizado ao longo de todo o trabalho experimental), que permitiu a separação dos picos presentes na amostra, a um espectrómetro de massa, responsável pela caracterização desses mesmos compostos. A amostra foi injectada no HPLC nas condições acima determinadas e, momentos antes da saída do pico de cada aducto (dado que os tempos de retenção esperados tinham já sido estudados) estabeleceu-se a ligação deste sistema a um espectrómetro de massa.

Com base na análise prévia das estruturas correspondentes aos monoconjugados da ADR com a GSH, foi estabelecida a massa molecular destes compostos (massa exacta de 488,16 g/mol e peso molecular de 488,51 g/mol) e, deste modo, estimada a massa molecular esperada para o ião molecular. Uma vez que o ião molecular corresponde à protonação do composto seria de esperar que, no espectro de m/z , surgisse um pico de massa aproximada de 489. Na Figura 4.10Figura 4.10, correspondente ao espectro de varrimento do segundo pico do cromatograma de HPLC, foi possível constatar a presença do pico correspondente ao ião molecular do monoconjugado.

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

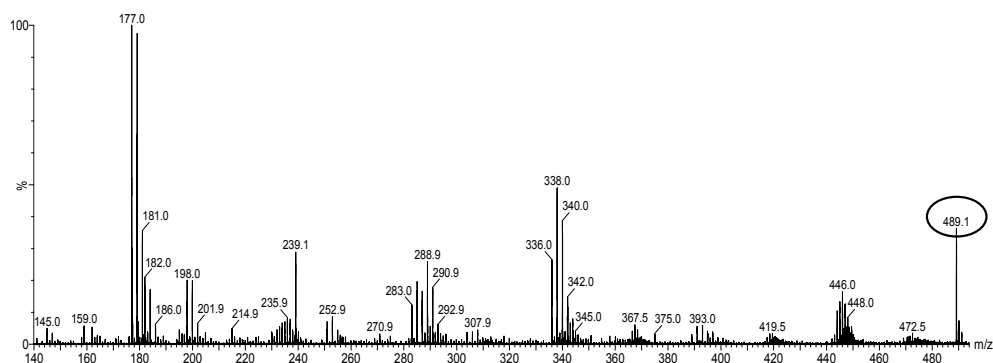


Figura 4.10 - Espectro ESI/MS obtido por varrimento no momento de saída do pico do 2º monoconjugado. Amostra injectada: TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR.

De salientar que, dada a semelhança entre os espectros ESI/MS obtidos para os dois picos do cromatograma obtido por HPLC, apenas se encontra aqui representado o referente ao segundo pico, que corresponde ao composto que se forma em maior extensão na reacção entre a ADR e a GSH.

Algumas informações estruturais são, igualmente, possíveis de obter, fragmentando a amostra dentro do aparelho e analisando os produtos gerados. Foi, de facto, o efectuado no âmbito deste trabalho, uma vez que o pico do ião molecular dos compostos em análise foi seleccionado e fragmentado, analisando-se o posterior padrão de quebras (**Figura 4.11** ~~Figura 4.14~~).

Deste modo, os espectros de decomposição de massa induzidos por colisão foram adquiridos seleccionando o ião desejado (ião molecular de cada composto) com a secção do quadrupólo do espectrómetro de massa e colidindo-o na cela de colisão, usando uma energia de colisão de 20–25 eV. Os produtos resultantes dessa colisão foram posteriormente determinados por um analisador de TOF (*Time of Flight*) (**Figura 4.11** ~~Figura 4.14~~).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: 12 pt

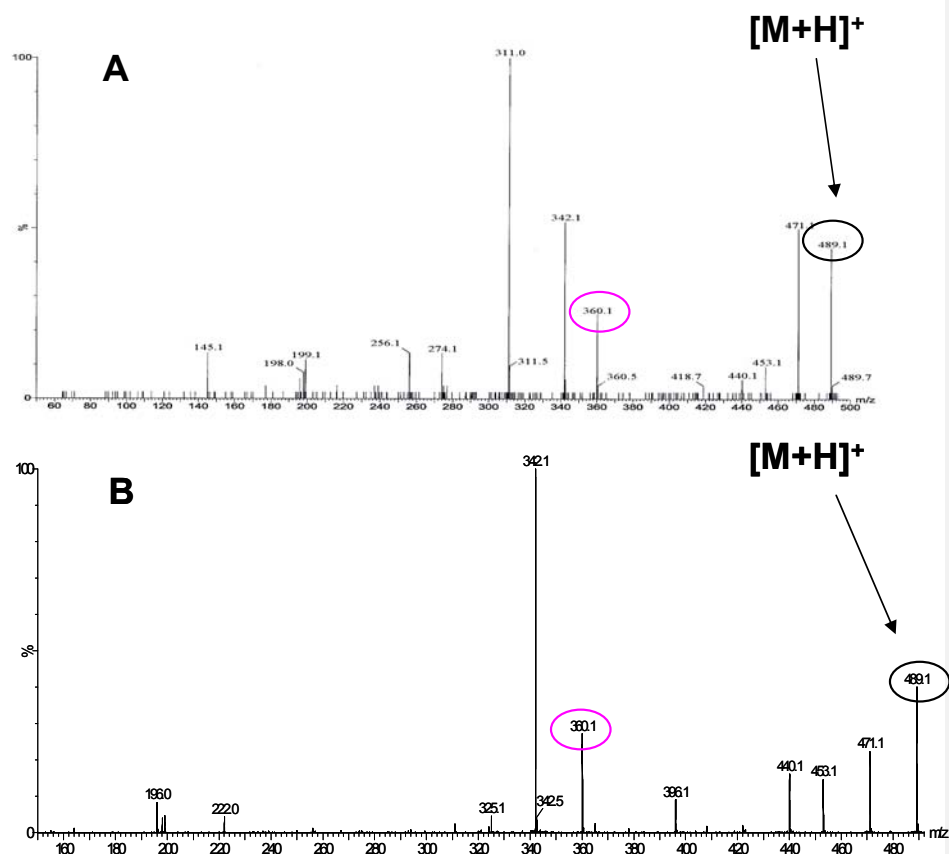


Figura 4.11 - Espectros ESI/MS/MS correspondentes ao fraccionamento do ião molecular detectado para cada composto (amostra injectada: TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR).

A - Espectro ESI/MS/MS obtido por fraccionamento do ião molecular correspondente ao 1º monoconjugado. B - Espectro ESI/MS/MS obtido por fraccionamento do ião molecular correspondente ao 2º monoconjugado.

Desta forma, acoplado ao sistema de HPLC encontrava-se um espectrómetro de massa Q-TOF 2 (Micromass), no qual a ionização era efectuada por electrospray e o analisador recorria à análise de tempos de voo (TOF). Os espectros de electrospray (ESI/MS) ([Figura 4.10](#)) e os espectros de massa em série (ESI/MS/MS - tandem mass spectra) ([Figura 4.11](#)) foram, deste modo, obtidos.

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

As análises efectuadas no sistema de HPLC-MS permitiram concluir, em definitivo, que os dois principais picos obtidos, após a reacção de oxidação (catalisada pela tirosinase), correspondem a monoconjugados da ADR com a GSH. Esta conclusão é suportada pela análise do padrão de quebras do ião molecular onde é, por exemplo, visível o aparecimento de um pico de massa correspondente à perda do grupo glutamyl da molécula de glutathione (pico de razão m/z 360,1). De salientar, ainda, que os dois aductos protonados sofreram um padrão de quebras inicial idêntico, com perda sucessiva de duas moléculas de água. Este estudo não permitiu, contudo, discernir a posição em que a GSH se encontra ligada ao anel catecol.

De salientar que, tal como referido anteriormente, este estudo de caracterização foi, até ao momento, realizado apenas para os produtos resultantes da reacção entre a ADR e a GSH.

4.2.3 Aducto 5-(glutathione-S-yl)adrenalina purificado

A caracterização dos compostos, utilizando o detector UV/VIS e o detector de massa, revelou que os dois principais produtos resultantes da reacção entre a ADR e a GSH (catalisada pela tirosinase) correspondem a monoconjugados. No entanto, não foi possível verificar em que local se encontrava ligada a molécula de GSH. Existem três locais possíveis de ligação da GSH ao anel catecol (posição 2, 5 e 6). A sua ligação nas posições 2 e 5 foi já referida quer para a DA (116, 117, 213, 228), quer para os metabolitos catecóis da MDMA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA (91, 166, 188). Por outro lado, a sua ligação na posição 6 foi referida para a α -MeDA (256). A identificação de um dos picos correspondentes a monoconjugados foi, no entanto, possível, através da injeção de uma amostra do aducto 5-(glutathione-S-yl)-adrenalina purificado, facultada pelo Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Deste modo, efectuou-se a injeção da amostra de aducto purificado e de uma amostra preparada em tampão fosfato contendo os dois monoconjugados da ADR com a

GSH, formados numa reacção catalisada pela tirosinase (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).

As duas amostras (20 μ L) foram injectadas nas mesmas condições cromatográficas obtendo-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.12](#).

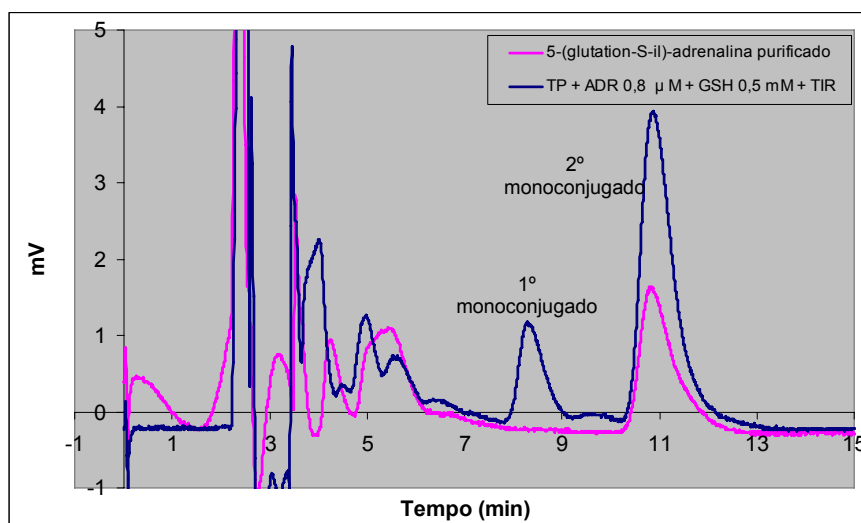


Figura 4.12 – Cromatogramas resultantes da injeção de 20 μ L de 5-(glutathion-S-yl)-adrenalina purificado (rosa) e de uma amostra de tampão que contém aductos da adrenalina com a GSH (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) (azul).

Deste modo, mediante a análise da [Figura 4.12](#), foi possível efectuar a comparação directa dos tempos de retenção correspondentes a cada um dos picos. Desta forma se conclui que o 2º pico, obtido após a injeção de uma mistura de reacção em tampão fosfato de ADR e GSH, corresponde ao monoconjugado cuja GSH se encontra ligada na posição 5 do anel catecol [5-(glutathion-S-yl)-adrenalina].

No âmbito do presente trabalho experimental, a validação da metodologia não recorreu à utilização deste composto como padrão de trabalho, uma vez que não está perfeitamente caracterizada a massa do contra-íão e, por conseguinte, não é conhecida exactamente a massa molecular do aducto sintetizado e purificado. Deste modo, pretende-se futuramente efectuar a validação da

metodologia recorrendo a este composto como padrão de trabalho permitindo, deste modo, a quantificação do aducto.

4.3. FASE III – Optimização das condições de detecção dos aductos das catecolaminas com a GSH

4.3.1 Estudos de linearidade

A avaliação da linearidade da resposta do detector coulométrico (electroquímico) em função da concentração da catecolamina envolvida na reacção com a GSH foi um dos estudos iniciais efectuados no âmbito do presente trabalho experimental. A ausência de linearidade excluiria a utilização do detector coulométrico na detecção destes compostos em amostras biológicas. Este parâmetro foi avaliado usando a ADR, NA e DA como catecolaminas intervenientes, e foi avaliado relativamente aos dois picos de monoconjugados formados durante a reacção destas catecolaminas com a GSH.

No caso específico da ADR, sabe-se que, em resultado da sua oxidação e posterior conjugação, ocorre a formação de dois compostos principais (monoconjugados), que correspondem aos dois primeiros picos do cromatograma ([Figura 4.13](#)~~Figura 4.13~~). Para concentrações mais elevadas de ADR é, também, possível detectar um terceiro composto, que corresponde, simultaneamente, ao terceiro maior pico do cromatograma e ao terceiro pico em termos de ordem de eluição (biconjugado, [Figura 4.4](#)~~Figura 4.4~~). Uma vez que a formação deste biconjugado só se observa para concentrações mais elevadas de catecolaminas, foi estudada a linearidade da resposta do detector aos monoconjugados.

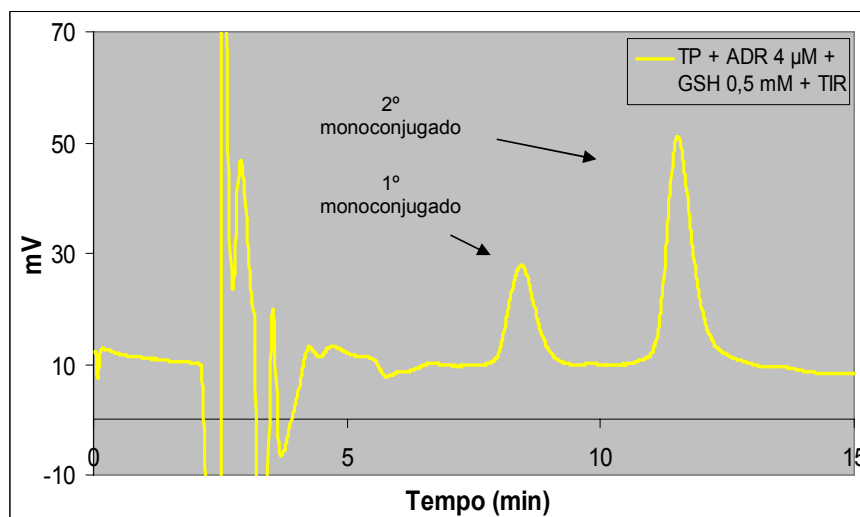


Figura 4.13 - Cromatograma obtido após injeção de 20 µL de uma mistura de reação contendo os adutos da ADR com a GSH (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).

Desta forma, efectuaram-se cinco misturas reacionais contendo diferentes concentrações de ADR (0,8; 1, 2, 4 e 8 µM) e a mesma concentração de GSH (0,5 mM). Após interrupção da reação pela adição de PCA a 15%, procedeu-se à injeção de 20 µL de cada mistura nas mesmas condições cromatográficas. Os cromatogramas obtidos por detecção electroquímica foram analisados e integradas as áreas dos dois picos correspondentes aos monoconjugados detectados, tal como ilustrado na [Tabela 4.2](#).

Tabela 4.2 - Área dos picos dos monoconjugados obtidos mediante a injeção de misturas de reação com diferentes concentrações de adrenalina (TP + ADR 0,8 a 8 µM + GSH 0,5 mM + TIR).

Amostra	Área do Pico do 1º Monoconjugado	Área do Pico do 2º Monoconjugado
ADR 0,8 µM	7,71E+04	1,89E+05
ADR 1 µM	9,70E+04	2,39E+05
ADR 2 µM	2,11E+05	6,36E+05
ADR 4 µM	3,90E+05	1,15E+06
ADR 8 µM	8,73E+05	2,47E+06

Com a determinação do valor das áreas dos dois picos detectados em cada cromatograma foi possível construir, para cada pico, as respectivas curvas de calibração, nas quais se representa a área de cada pico em função da concentração de adrenalina na mistura reaccional ([Figura 4.14](#)~~Figura 4.14~~)

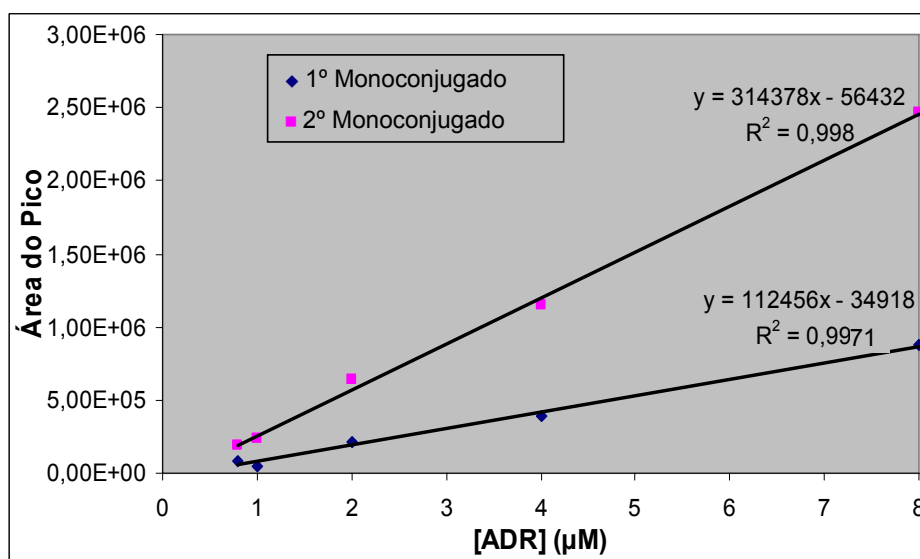


Figura 4.14 - Curvas de calibração do valor da área de cada pico em função da concentração de adrenalina na mistura de reacção (TP + ADR 0,08 a 8 µM + GSH 0,5 mM + TIR).

Pela análise da [Figura 4.14](#)~~Figura 4.14~~ foi possível verificar que existe uma resposta linear do detector na gama de concentrações testada (coeficiente de regressão linear - $R^2=0,995$ e $0,998$ para o 1º e 2º monoconjugados, respectivamente), uma vez que se verificou que o sinal obtido (área do pico) é directamente proporcional à concentração final da catecolamina usada na mistura de reacção.

O presente estudo de linearidade foi, igualmente, efectuado em misturas reaccionais contendo NA como catecolamina envolvida na síntese dos aductos com a GSH. Também no caso desta catecolamina, como resultado da sua oxidação e posterior conjugação com a GSH, ocorre a formação de dois aductos principais, que correspondem aos dois principais picos do cromatograma ([Figura 4.15](#)~~Figura 4.15~~). Para concentrações mais elevadas de NA, e tal como acontece

para a ADR, é possível detectar um terceiro composto que corresponde ao terceiro maior pico do cromatograma (biconjugado, [Figura 4.6](#)Figura 4.6).

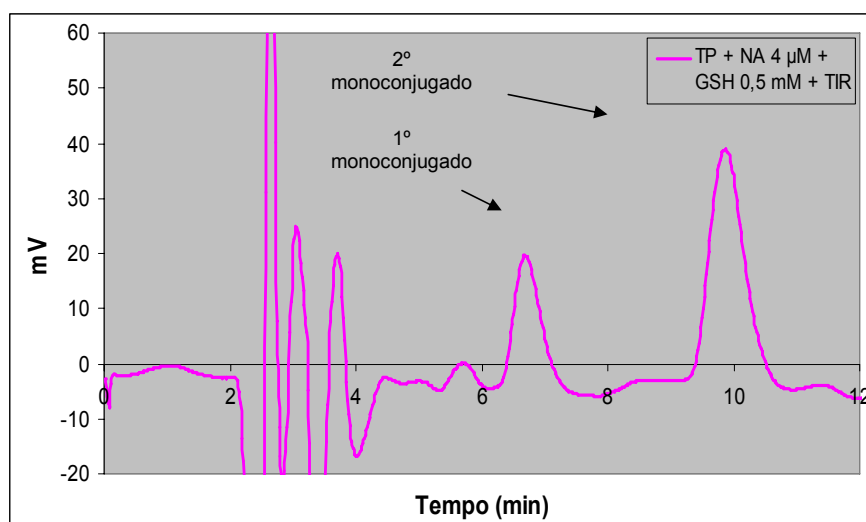


Figura 4.15 - Cromatograma obtido após injeção de 20 μL de uma mistura de reacção efectuada em tampão contendo noradrenalina (TP + NA 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR).

No sentido de avaliar a resposta do detector coulométrico face à presença dos dois principais compostos formados (monoconjugados) efectuaram-se 8 misturas reaccionais contendo diferentes concentrações de NA (0,08; 0,16; 0,2; 0,4; 0,8; 2; 4 e 10 μM) e a mesma concentração de GSH (0,5 mM). Após a injeção no sistema de HPLC-ED de 20 μL de cada mistura reaccional (TP + NA 0,08 a 10 μM + GSH 0,5 mM + TIR), nas mesmas condições cromatográficas, os cromatogramas obtidos por detecção electroquímica foram analisados e integradas as áreas dos dois principais picos detectados correspondentes aos monoconjugados da NA com a GSH, tal como ilustrado na [Tabela 4.3](#)Tabela 4.3.

Tabela 4.3- Área dos picos dos monoconjugados obtidos mediante a injeção de misturas de reacção com diferentes concentrações de noradrenalina (TP + NA 0,08 a 10 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).

Amostra	Área do Pico do 1º Monoconjugado	Área do Pico do 2º Monoconjugado
NA 0,08 μ M	2,65E+04	5,26E+04
NA 0,16 μ M	3,03E+04	5,00E+04
NA 0,2 μ M	2,30E+04	1,11E+05
NA 0,4 μ M	6,77E+04	1,64E+05
NA 0,8 μ M	1,20E+05	2,80E+05
NA 2 μ M	3,75E+05	9,16E+05
NA 4 μ M	7,06E+05	1,63E+06
NA 10 μ M	1,61E+06	3,90E+06

Após a integração das áreas dos dois principais picos detectados nos cromatogramas de cada mistura reaccional foi possível construir, para cada pico, a respectiva curva de calibração. A curva de calibração corresponde à representação gráfica da área de cada pico em função da concentração de NA na mistura reaccional ([Figura 4.16](#)~~Figura 4.16~~).

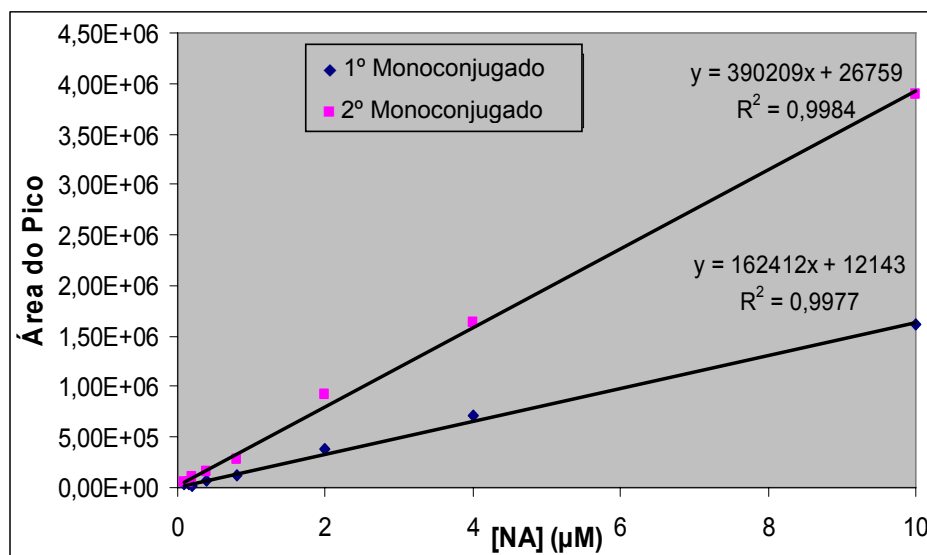


Figura 4.16 - Curvas de calibração do valor da área de cada pico em função da concentração de noradrenalina na mistura de reacção (TP + NA 0,08 a 10 µM + GSH 0,5 mM + TIR).

No caso dos monoconjugados da NA com a GSH constatou-se a existência de linearidade de resposta do detector face à presença destes compostos na mistura reaccional, na gama de concentrações testada. De facto, existe uma relação linear entre a área de cada pico e a concentração de noradrenalina na mistura reaccional, linearidade essa comprovada pelos valores de R^2 obtidos em cada curva de calibração (0,9984 e 0,9977).

Por último, avaliou-se a linearidade da resposta do detector coulométrico relativamente aos aductos formados pela reacção entre a DA e a GSH catalisada pela tirosinase ([Figura 4.17](#)[Figura 4.17](#)). Para concentrações mais elevadas de catecolamina é, igualmente, possível detectar no cromatograma um terceiro pico (biconjugado, [Figura 4.8](#)[Figura 4.8](#)). Contudo, contrariamente ao que acontece no caso da ADR e da NA, este terceiro maior pico tem um tempo de retenção intermédio situando-se entre os picos dos dois principais compostos formados ([Figura 4.8](#)[Figura 4.8](#)).

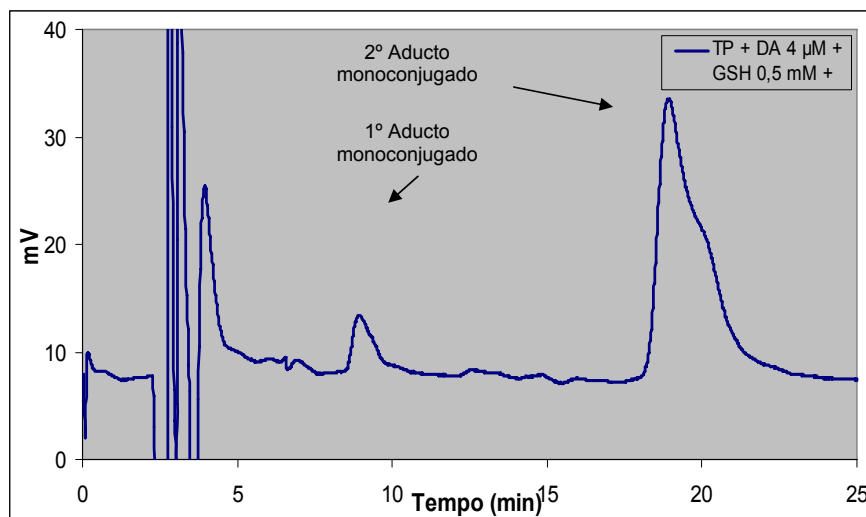


Figura 4.17 - Cromatograma obtido após injeção de 20 µL de uma mistura de reacção efectuada em tampão com a dopamina (TP + DA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).

Para a determinação da linearidade da resposta do detector aos monoconjugados da DA com a GSH efectuaram-se 5 misturas reaccionais contendo diferentes concentrações de DA (0,16; 0,8; 4; 20 e 100 µM) e a mesma concentração de glutatona (0,5 mM). Após a injeção no sistema de HPLC-ED de 20 µL de cada mistura reaccional (TP + DA 0,16 a 100 µM + GSH 0,5 mM + TIR) nas mesmas condições cromatográficas, os dois principais picos obtidos em cada cromatograma foram analisados e integradas as áreas correspondentes, tal como ilustrado na [Tabela 4.4](#).

Tabela 4.4 - Área dos dois principais picos obtido mediante a injeção de misturas de reacção com diferentes concentrações de dopamina (TP + DA 0,16 a 100 µM + GSH 0,5 mM + TIR).

Amostra	Área do Pico do 1º Monoconjugado	Área do Pico do 2º Monoconjugado
DA 0,16 µM	9,86E+03	5,09E+04
DA 0,8 µM	3,55E+04	4,83E+05
DA 4 µM	1,95E+05	2,43E+06
DA 20 µM	1,05E+06	1,12E+07
DA 100 µM	5,37E+06	5,01E+07

Com base nas áreas obtidas em cada cromatograma relativamente a esses dois picos construiu-se, para cada pico, a respectiva curva de calibração a qual, tal como já referido, corresponde à representação gráfica da área de cada pico em função da concentração de dopamina na mistura reaccional ([Figura 4.18](#)).

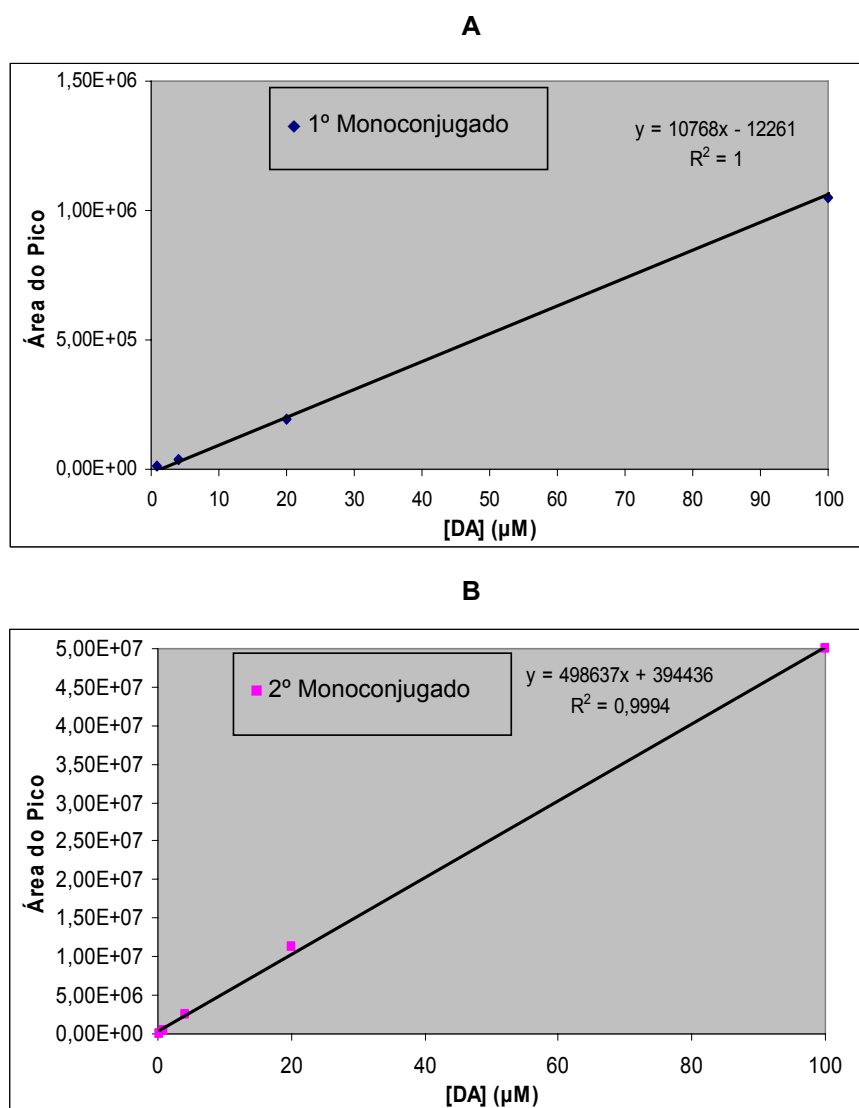


Figura 4.18 - Curvas de calibração do valor da área de cada pico em função da concentração de dopamina na mistura de reacção (TP + DA 0,16 a 100 µM + GSH 0,5 mM + TIR). A – 1º monoconjugado; B – 2º monoconjugado.

Pela análise da ~~Figura 4.18~~**Figura 4.18** foi possível comprovar a existência de uma resposta linear do detector face à presença destes aductos no eluído da coluna cromatográfica. Os valores de R^2 obtidos em cada curva de calibração (0,9994 e 1) indicam a existência de uma relação linear entre a área de cada pico e a concentração de DA na mistura reaccional.

Os resultados obtidos revelaram, deste modo, que o detector coulométrico apresenta uma resposta linear face à presença dos principais compostos resultantes da reacção entre as catecolaminas (ADR, NA e DA) e a GSH, ou seja, à presença dos monoconjugados das três catecolaminas testadas. Adicionalmente, verificaram-se diferenças na intensidade da resposta do detector perante os diferentes compostos analisados. As diferenças observadas podem ser explicadas pelo facto de os dois monoconjugados não se formarem nas mesmas proporções para as diferentes catecolaminas ou devido a diferenças de sensibilidade do detector perante compostos que derivam de catecolaminas diferentes. Por outro lado, convém salientar que o estudo de voltametria foi apenas efectuado para os monoconjugados da ADR. Por conseguinte, para a análise de aductos da NA e DA com a GSH poderá ser necessário optimizar os potenciais do detector electroquímico.

4.3.2 Estabilidade dos aductos em função do pH

Durante o processo de extracção pela alumina (abordado em pormenor mais à frente nesta dissertação), os aductos são sujeitos a diferentes valores de pH (nomeadamente pH 8,2-8,6 durante a etapa de agitação com tampão Tris/EDTA). Tornou-se, deste modo, imperativo avaliar a estabilidade destes compostos em função do pH.

As misturas reaccionais utilizadas no âmbito do presente estudo foram efectuadas utilizando a ADR como catecolamina envolvida na reacção a qual, após oxidação catalisada pela tirosinase, sofre conjugação com a GSH formando os correspondentes aductos (na forma catecólica) cuja estabilidade foi, então,

avaliada a diferentes valores de pH. Deste modo, e após finalização da reacção pela adição de PCA a 15% (Figura 3.1), as misturas reaccionais foram submetidas à alteração de pH pela adição de NaOH 0,1 N (o pH final da mistura de reacção após tratamento com PCA a 15% é inferior a 1 e, por isso, esse valor foi alterado pela adição desta solução básica). Neste estudo, foram igualmente injectadas ao longo dos dias de estudo misturas reaccionais (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR), para as quais não se procedeu à alteração do valor do pH (amostras controlo).

4.3.2.1. Estabilidade dos aductos em PCA a 5% (pH < 1)

A insuficiente estabilidade do composto a analisar durante o armazenamento ou a análise pode dar origem a desvios significativos no resultado da análise. Por este motivo, antes de efectuar a avaliação da estabilidade dos aductos das catecolaminas com a GSH em função do valor do pH da amostra, avaliou-se a referida estabilidade após a finalização da reacção pela adição de ácido perclórico a 15% (numa concentração final de 5%). Para o efeito, efectuou-se um estudo de estabilidade dos aductos da ADR com a GSH à temperatura ambiente, ao longo de um período de oito dias. Deste modo, preparou-se uma mistura reaccional contendo ADR como catecolamina interveniente na formação dos aductos (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR). Após a interrupção da reacção pela adição de ácido perclórico, foram preparadas alíquotas que foram injectadas (20 μ L) cinco vezes nas mesmas condições cromatográficas, ao longo do referido período de tempo.

Após obtenção, por detecção electroquímica, dos respectivos cromatogramas procedeu-se à integração das áreas dos dois picos detectados, que se encontram representadas na [Tabela 4.5](#).

Tabela 4.5 - Áreas do pico do 1º e 2º monoconjugados, obtidas durante o estudo de estabilidade em PCA a 5% à temperatura ambiente e ao longo de 8 dias de estudo (amostra: TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).

Dia	Área do Pico do 1º Monoconjugado	Área do Pico do 2º Monoconjugado
1	2,39E+05	1,02E+06
2	2,07E+05	8,11E+05
6	2,41E+05	9,19E+05
7	2,22E+05	8,57E+05
8	2,59E+05	1,01E+06
Média	2,34E+05	9,22E+05
Desvio Padrão	2,00E+04	9,09E+04
Coefficiente de Variação (CV,%)	8,54	9,85

Formatted Table

Pela análise da ~~Tabela 4.5~~ foi possível comprovar que os aductos resultantes da conjugação das catecolaminas com a GSH se mantêm estáveis, à temperatura ambiente, por um período de, pelo menos, oito dias (CV<10%).

Para padronizar o possível efeito decorrente de alterações da sensibilidade do detector coulométrico ao longo do tempo pode ser utilizado um padrão interno, o que permite expressar os resultados em termos de razão entre a área de cada pico e a área do pico do padrão interno. Dada a inexistência de padrão interno neste trabalho, foi usada a razão entre a área do pico do 1º monoconjugado e a área do pico do 2º monoconjugado para monitorizar eventuais alterações de sensibilidade do detector electroquímico durante os oito dias de estudo. A razão das áreas dos picos, assim como, o respectivo valor médio, desvio padrão e coeficiente de variação encontram-se representados na ~~Tabela 4.6~~.

Tabela 4.6 - Razão entre as áreas dos picos do 1º e 2º monoconjugados, obtidas durante o estudo de estabilidade em PCA a 5% à temperatura ambiente e ao longo de 8 dias de estudo (amostra: TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).

Dia	Razão entre P1 e P2
1	2,34E-01
2	2,55E-01
6	2,62E-01
7	2,59E-01
8	2,56E-01
Média	2,53E-01
Desvio Padrão	1,10E-02
Coefficiente de Variação (CV,%)	4,35

Formatted Table

A análise da ~~Tabela 4.6~~ Tabela 4.6 permitiu confirmar a estabilidade destes compostos à temperatura ambiente por um período de, pelo menos, oito dias. A análise dos resultados obtidos no estudo recorrendo à razão entre as áreas dos dois picos detectados permitiu a obtenção de um coeficiente de variação inferior aos apresentados na ~~Tabela 4.5~~ Tabela 4.5. Tal facto parece dever-se a uma atenuação, por este processo, dos efeitos decorrentes de possíveis alterações da sensibilidade do detector electroquímico ao longo dos dias de estudo.

De salientar que a estabilidade destes compostos foi, novamente, comprovada durante o estudo de validação da precisão intermédia, efectuado com amostras mantidas 5 dias à temperatura ambiente (~~Tabela 4.28~~ Tabela 4.28).

Contudo, será recomendável realizar um estudo da estabilidade destes compostos a diferentes temperaturas de conservação e por períodos de tempo mais prolongados. Nesse estudo dever-se-á ter em linha de conta que a estabilidade de um composto num fluido biológico é função das condições de armazenamento, das suas propriedades químicas, da matriz e do material do

recipiente de armazenamento. Além disso, a estabilidade de um analito numa matriz particular e num determinado recipiente é, apenas, relevante para essa matriz e para esse recipiente e não deve ser extrapolada para outras matrizes e recipientes de armazenamento. Por conseguinte, os procedimentos de análise de estabilidade deverão avaliar a estabilidade dos analitos durante a colheita e manuseamento das amostras, após armazenamento de curto prazo (temperatura ambiente) e longo prazo (congelamento à temperatura de armazenamento pretendida) e após a amostra passar por ciclos de congelamento e descongelamento para ser usada no processo analítico. As condições usadas nos estudos de estabilidade deverão reflectir situações que provavelmente serão encontradas durante o manuseamento e análise da amostra e todas as determinações de estabilidade deverão utilizar um conjunto de amostras preparadas recentemente na matriz biológica em análise.

4.3.2.2. pH 12,0

No presente estudo, procedeu-se à síntese dos aductos da ADR com a GSH (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) e, após finalização da reacção, procedeu-se à alteração do valor de pH para 12,0 pela adição de NaOH 0,1 N. A partir do momento em que foi efectuada essa alteração, iniciou-se a contagem do tempo para determinar o período de tempo em que os compostos permaneceram a esse valor de pH. Desta forma, a amostra (20 µL) foi injectada 1, 90 e 180 minutos após a referida alteração. A amostra foi mantida no *vial* para injeção no HPLC à temperatura ambiente (TA) e injectada, novamente, 24 horas após a referida alteração do pH. Foi, igualmente, injectada uma amostra (20 µL) idêntica à anterior, mas sem a referida alteração do valor de pH, designada por amostra controlo. Os respectivos cromatogramas foram obtidos por detecção electroquímica e encontram-se ilustrados na [Figura 4.19](#)~~Figura 4.19~~.

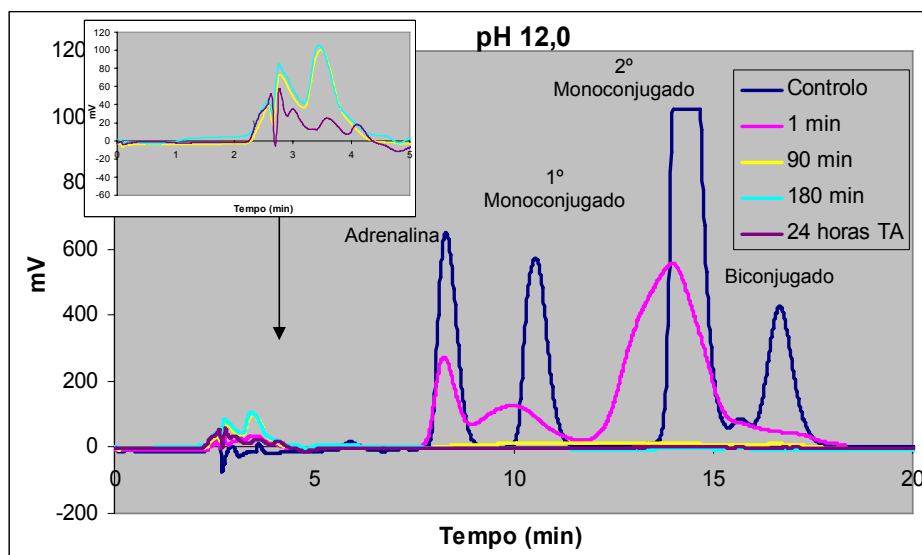


Figura 4.19 - Cromatogramas resultantes da injeção de 20 μ L de uma mistura de reação (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) a pH 12,0.

Pela análise da [Figura 4.19](#) verificou-se que, imediatamente após a alteração do pH (1 minuto), ocorreu a alteração da estabilidade dos aductos, dando origem a um cromatograma com reduzida definição. Essa alteração de estabilidade tornou-se ainda mais evidente quando se procedeu às injeções seguintes. De facto, constatou-se o desaparecimento, por completo, dos picos correspondentes aos mono e biconjugados da ADR com a GSH. Verificou-se, ainda, o aparecimento de um novo pico, com má definição e resolução, o qual apresentou um tempo de retenção inferior a 5 minutos (3,4 minutos). A caracterização desse pico foi possível, uma vez que se encontrava acoplado ao sistema de HPLC um segundo detector – detector UV/VIS – o qual permitiu a obtenção do espectro UV/VIS correspondente a esse composto. Pela análise do espectro ([Figura 4.20](#)) identificaram-se um máximo de absorvância a 266 e dois patamares (*shoulders*) a 308 nm e 380nm que, de acordo com a literatura, correspondem a conjugados das catecolaminas com a GSH mas, ao contrário dos aductos alvo deste estudo, a catecolamina não se encontra na forma catecólica mas sim na forma quinónica (conjugado da catecolamina o-quinona com a GSH) (213).

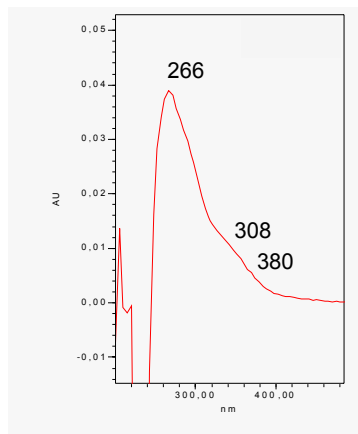


Figura 4.20 - Espectro de absorvância do composto formado como consequência da alteração do valor de pH (tempo de retenção: 3,4 minutos).

Desta forma conclui-se que a alteração do valor de pH para um valor extremamente alcalino promove a oxidação dos aductos da adrenalina com a GSH (na forma catecólica), com a consequente formação de aductos cujo anel se encontra na forma quinónica ([Figura 4.21](#)). Na medida em que a alteração da amostra foi quase imediata à alteração do pH, não se procedeu ao congelamento de uma alíquota da amostra com o objectivo de averiguar a estabilidade dos compostos a pH 12,0 quando armazenados a -80 °C.

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

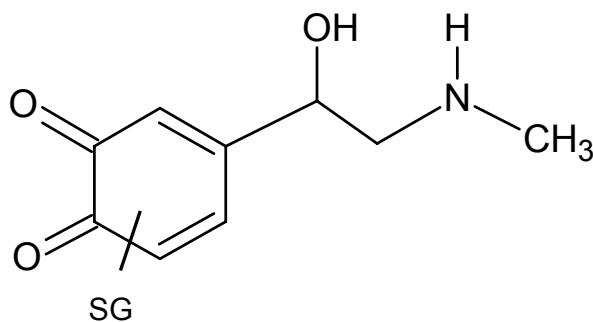
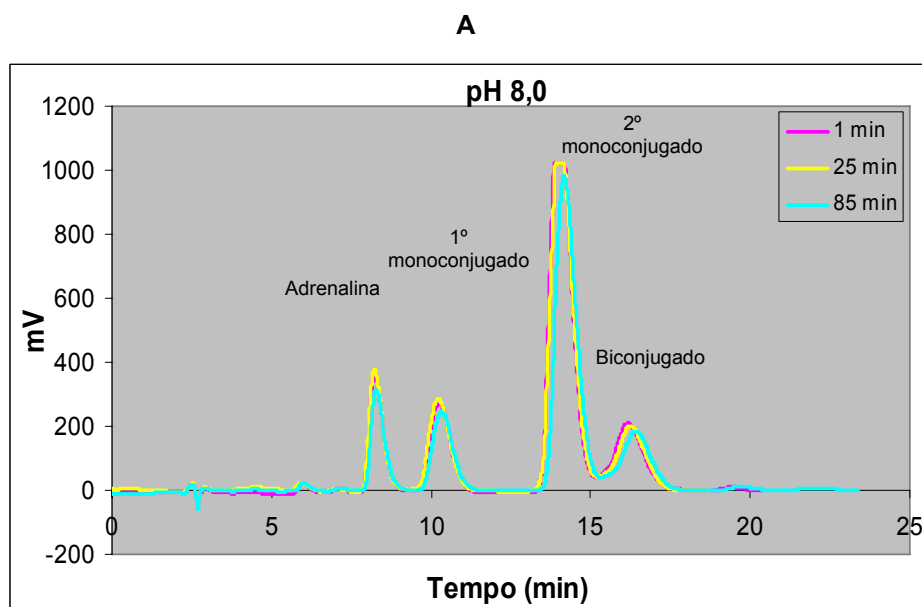


Figura 4.21 - Estrutura química dos aductos da adrenalina com a GSH na forma quinónica.

4.3.2.3. pH 8,0

O procedimento utilizado para avaliação da estabilidade dos compostos a pH 8,0 foi idêntico ao efectuado no estudo anterior. Foi preparada a mistura reaccional (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) que, após alteração do valor de pH para 8,0 (pela adição de NaOH 0,1 N), foi injectada 1, 25 e 85 minutos após a referida alteração. De salientar que, quando a amostra foi injectada 85 minutos após a alteração do pH foi, simultaneamente, retirada uma alíquota, a qual foi armazenada a -80 °C para injeção 24 horas após a alteração do pH. A restante amostra permaneceu no *vial* de injeção à temperatura ambiente aguardando, igualmente, a posterior injeção 24 horas depois. O volume de injeção das amostras foi, tal como no estudo anterior, de 20 µL e os cromatogramas foram, igualmente, obtidos por detecção electroquímica e encontram-se ilustrados na [Figura 4.22](#) ~~Figura 4.22~~.



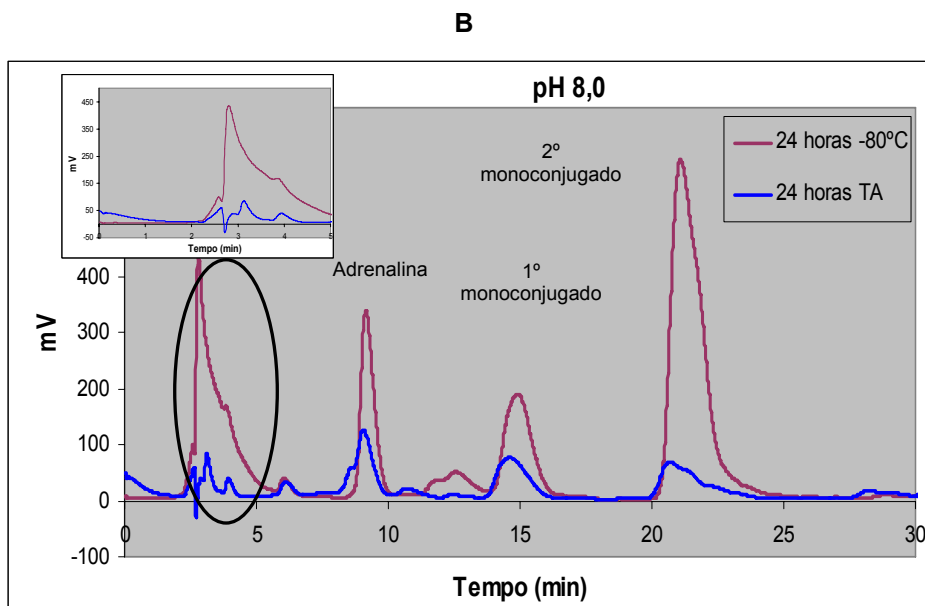


Figura 4.22 - Cromatogramas resultantes da injeção de 20 μ L de uma mistura de reação (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) a pH 8,0.

A – Cromatogramas obtidos através da injeção da amostra no próprio dia da alteração de pH.

B – Cromatogramas obtidos através da injeção da amostra 24 horas após a referida alteração.

Pela análise da [Figura 4.22](#) foi possível observar que, 24 horas após a alteração do pH, ocorreu uma alteração dos tempos de retenção dos compostos presentes na amostra (aumento do tempo de retenção). Esta alteração foi monitorizada através da amostra controlo que não se encontra aqui representada. As áreas dos dois picos detectados nos cromatogramas correspondentes aos dois dias de estudo foram integradas e encontram-se ilustradas na [Tabela 4.7](#).

Tabela 4.7 - Área dos picos correspondentes aos monoconjugados obtidos mediante a injeção de uma amostra (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) com o pH final de 8,0, em função do tempo.

Tempo decorrido desde a alteração do pH	Área do Pico do 1º Monoconjugado	Área do Pico do 2º Monoconjugado
1 min	1,22E+07	5,02E+07
25 min	1,19E+07	4,99E+07
85 min	1,05E+07	4,25E+07
CV (%)	7,93	9,19
24 horas -80°C	9,05E+06	2,47E+07
24 horas TA	4,47E+06	3,56E+06

Para o valor de pH 8,0, os compostos permaneceram estáveis por um período razoável de tempo, dada a ausência de diferenças entre os cromatogramas obtidos 1 e 25 minutos após a alteração do pH. Uma hora depois desta última injeção (ou seja, 85 minutos após a alteração do valor de pH da mistura reaccional) observou-se uma ligeira diminuição da área dos picos, sugerindo uma possível degradação dos compostos. No entanto, dado que os aductos apenas permanecem 15 minutos a pH ligeiramente superior a 8,0 (8,2-8,6), durante o processo de extracção pela alumina, pode-se considerar mínimo o risco de degradação dos compostos (uma vez que até aos 25 minutos não existem diferenças em termos de área dos picos). Contudo, 24 horas após a alteração do valor de pH, as diferenças são notórias quer para a alíquota armazenada a -80 °C quer para a restante amostra mantida à temperatura ambiente (~~Tabela 4.7~~~~Tabela 4.7~~ e ~~Figura 4.22~~~~Figura 4.22~~). De salientar, sobretudo na amostra armazenada a -80 °C, a formação de um composto de tempo de retenção inferior a 5 minutos (3,4 minutos) que foi, novamente, caracterizado através do respectivo espectro de UV/VIS. O espectro obtido foi idêntico ao ilustrado na ~~Figura 4.20~~~~Figura 4.20~~, com máximos de absorvância a 266, 308 e 380 nm, sugerindo a presença de conjugados da adrenalina com a glutatona nos quais o anel da catecolamina se encontra na forma quinónica

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

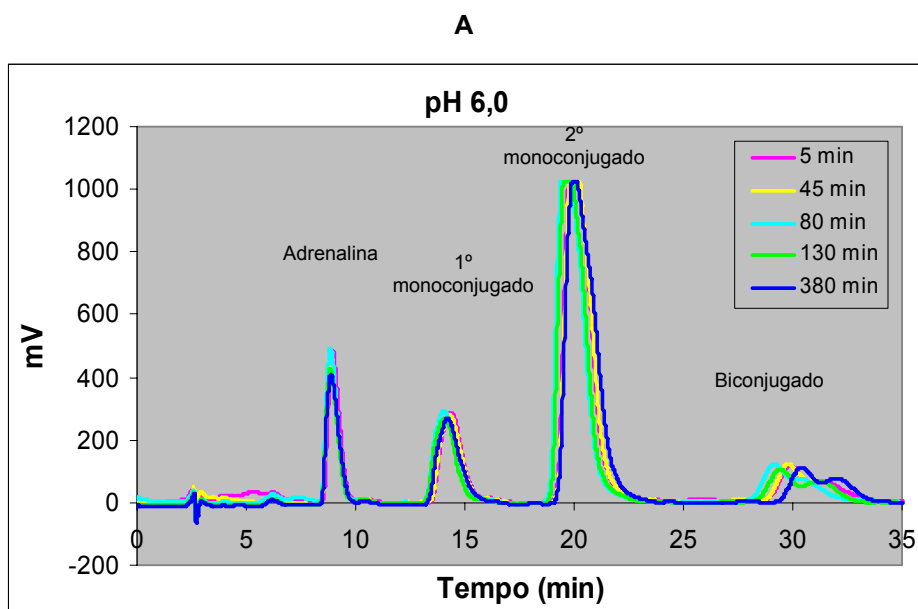
(Figura 4.21Figura 4.21). Apesar da formação do composto acima citado, não ocorre a degradação (oxidação) completa dos monoconjugados, uma vez que continua a ser possível detectar os picos correspondentes a estes aductos (Figura 4.5Figura 4.5).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

4.3.2.4. pH 6,0

No presente estudo seguiram-se as orientações gerais já descritas para a avaliação da estabilidade dos compostos em função do valor de pH. Para o efeito, foram preparadas duas misturas reaccionais (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR), uma delas não submetida a qualquer ajuste do pH (controlo) e a outra sujeita à alteração do valor deste para 6,0 (mediante adição de NaOH 0,1 N). A amostra que sofreu a referida alteração do pH foi injectada (20 µL) ao longo do tempo [5, 45, 80, 130, 380 min e 24 horas à temperatura ambiente (TA)]. Os respectivos cromatogramas foram obtidos por detecção electroquímica e encontram-se ilustrados na Figura 4.23Figura 4.23.



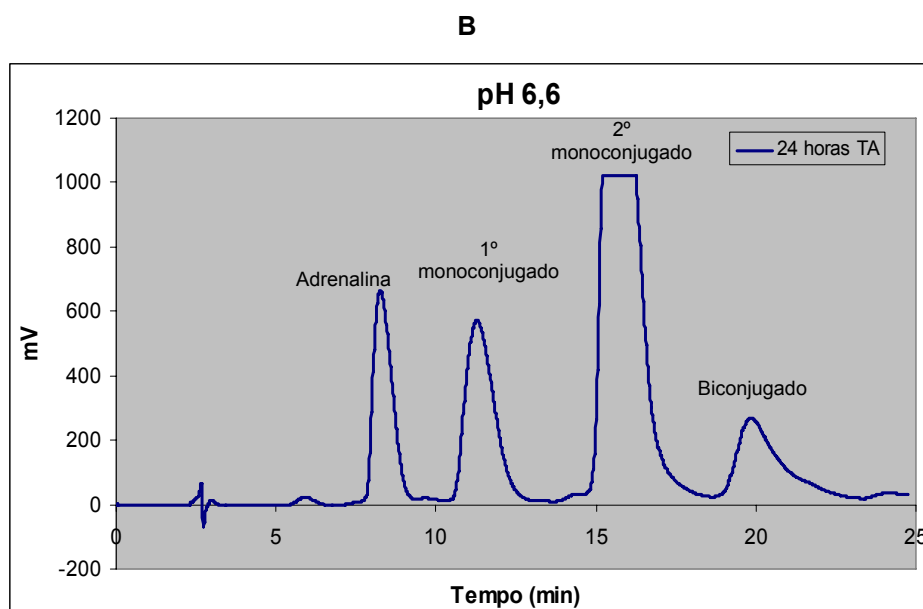


Figura 4.23 - Cromatogramas resultantes da injeção de 20µL de uma mistura de reacção (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) a pH 6,0.

A – Cromatogramas obtidos através da injeção da amostra no próprio dia da alteração de pH.

B – Cromatogramas obtidos através da injeção da amostra 24 horas após a referida alteração.

Pela análise da ~~Figura 4.23~~ **Figura 4.23** foi possível observar uma antecipação dos tempos de retenção dos compostos, acompanhada de uma alteração da sensibilidade do detector. De facto, através da análise dos cromatogramas das amostras controlo (resultados não apresentados) foi possível constatar uma alteração da sensibilidade do detector face à presença dos dois principais compostos detectados (correspondentes a monoconjugados). Por este motivo, as áreas obtidas no segundo dia foram recalculadas tendo em consideração a referida alteração da sensibilidade. Pelo contrário, pôde efectuar-se a comparação directa dos resultados obtidos num mesmo dia de estudo, uma vez que a injeção da amostra controlo ao longo do dia não revelou alterações de sensibilidade nem de tempos de retenção.

Através da análise comparativa da ~~Figura 4.23~~ **Figura 4.23-A** não se detectaram diferenças entre os cromatogramas obtidos ao longo do primeiro dia

de estudo. Este facto foi comprovado através da integração das áreas dos picos dos dois monoconjugados identificados nos cromatogramas, cujos valores de coeficiente de variação (%) são bastante reduzidos ([Tabela 4.8](#)~~Tabela 4.8~~).

Tabela 4.8 - Área dos dois principais picos obtidos mediante a injeção de uma amostra (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) com o pH alterado para um valor de 6,0, em dois dias consecutivos.

Tempo decorrido desde a alteração do pH	Área do Pico do 1º Monoconjugado	Área do Pico do 2º Monoconjugado
5 min	1,78E+07	8,71E+07
45 min	1,78E+07	8,58E+07
80 min	1,81E+07	8,78E+07
130 min	1,82E+07	8,72E+07
380 min	1,73E+07	8,72E+07
CV (%)	1,97	0,85
24 horas TA	1,88E+07	1,07E+08
CV (%) (24 horas)	3,12	9,93

Pela análise do cromatograma obtido 24 horas após a alteração do valor de pH ([Figura 4.23](#)~~Figura 4.23~~-B), e pela análise das áreas definidas na [Tabela 4.8](#)~~Tabela 4.8~~ foi possível constatar que a conservação das amostras à temperatura ambiente leva a um aumento da área dos picos detectados, sobretudo do pico do 2º monoconjugado (CV>10%). Uma explicação possível poderá ser a síntese não catalisada do aducto a este pH. Por conseguinte, a segurança das condições de armazenamento das amostras a este valor de pH deverá ser estudada futuramente.

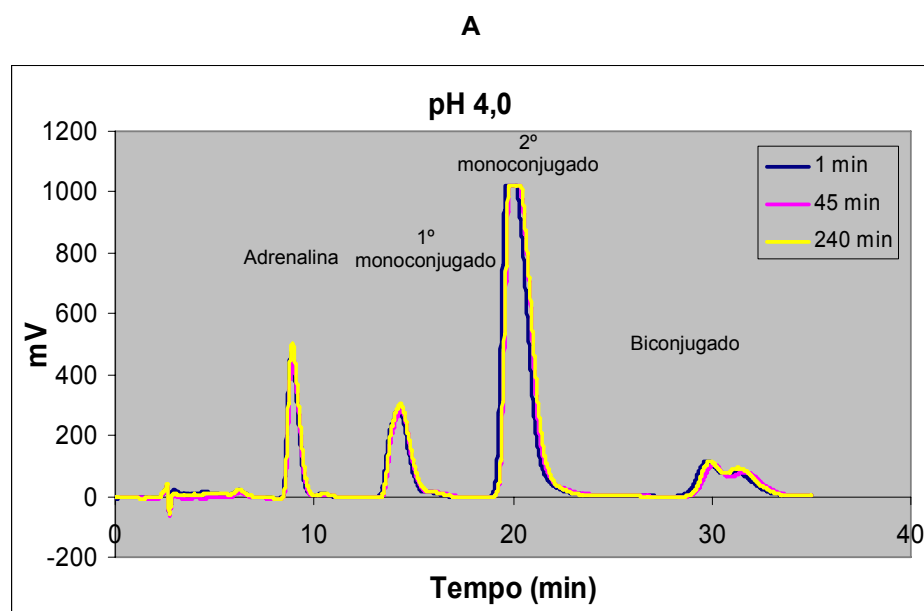
Adicionalmente, o estudo da estabilidade dos aductos das catecolaminas com a GSH a pH 6,0 foi repetido utilizando uma menor concentração final de ADR na mistura reaccional (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR). Os resultados

obtidos (resultados não apresentados) comprovaram os resultados obtidos no estudo efectuado com uma concentração superior de ADR.

4.3.2.5. pH 4,0

Por último, foi estudada a estabilidade dos aductos a um valor mais baixo de pH, isto é, pH 4,0. Tal como no estudo anterior, também aqui foi necessário efectuar a correcção dos valores de áreas obtidos no segundo dia dada a alteração da sensibilidade do detector.

No âmbito do presente estudo, após a alteração do pH da mistura reaccional (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) procedeu-se à injeção sucessiva de 20 μ L de amostra ao longo do tempo (1, 45, 240 min e 24 horas à TA). Os respectivos cromatogramas foram obtidos por detecção electroquímica e encontram-se ilustrados na [Figura 4.24](#) ~~Figura 4.24~~.



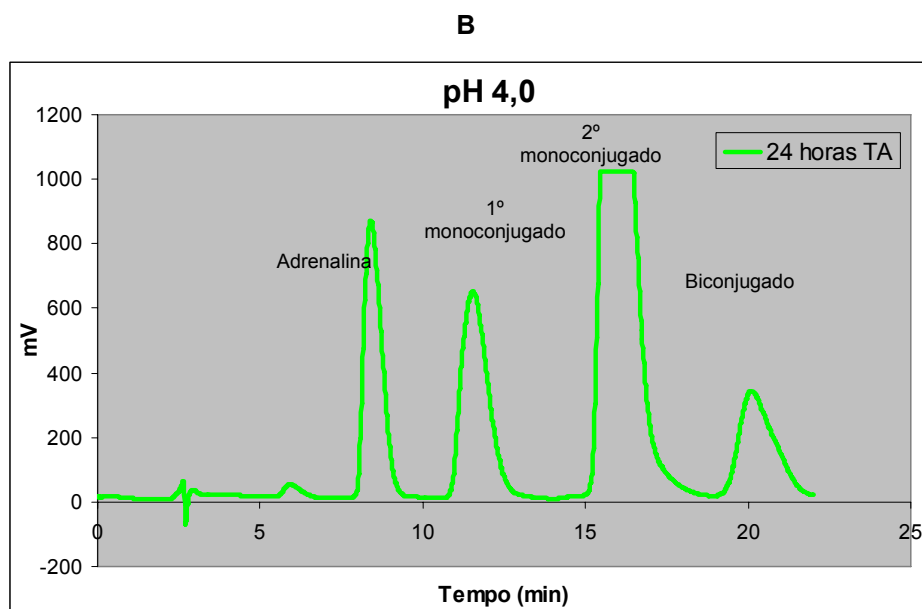


Figura 4.24 – Cromatogramas resultantes da injeção de 20 μ L de uma mistura de reacção (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) a pH 4,0.

A – Cromatogramas obtidos através da injeção da amostra no próprio dia da alteração de pH.

B – Cromatogramas obtidos através da injeção da amostra 24 horas após a referida alteração.

As áreas dos picos dos monoconjugados da ADR com a GSH são apresentadas na [Tabela 4.9](#)~~Tabela 4.9~~. De salientar a correcção dos valores obtidos no segundo dia com base nas diferenças obtidas relativamente às injeções da amostra controlo (não ilustradas).

Tabela 4.9 - Área dos dois principais picos obtidos mediante a injeção de uma amostra (TP + ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM + TIR) com o pH alterado para um valor 4,0, em dois dias consecutivos.

Tempo decorrido desde a alteração do pH	Área do Pico do 1º Monoconjugado	Área do Pico do 2º Monoconjugado
1 min	1,86E+07	9,13E+07
45 min	1,84E+07	9,18E+07
240 min	2,00E+07	9,55E+07
CV (%)	4,65	2,48
24 horas TA	1,97E+07	1,02E+08
CV (%) (24 horas)	4,17	4,96

Pela análise dos resultados obtidos neste estudo ([Figura 4.24](#) e [Tabela 4.9](#)) foi possível confirmar a estabilidade dos compostos a este valor de pH, dada a ausência de diferenças relevantes entre os valores de áreas dos picos obtidos (CV 24 horas < 5%). Desta forma, constata-se a possibilidade de conservação das amostras em meio ácido, mesmo à temperatura ambiente, uma vez que está garantida a estabilidade dos compostos alvo do estudo.

O estudo da estabilidade dos aductos das catecolaminas com a GSH a pH 4,0 foi repetido utilizando uma menor concentração de catecolamina na mistura reaccional (TP + ADR 4µM + GSH 0,5mM + TIR). Os resultados obtidos (resultados não apresentados) comprovaram os resultados obtidos no estudo efectuado com uma concentração superior de ADR.

4.3.2.6. Conclusão

Os resultados obtidos nos estudos de estabilidade em função do valor do pH permitiram verificar que, após interrupção da reacção da ADR oxidada com a GSH por adição de ácido perclórico, os aductos são estáveis, à temperatura ambiente, por um período de, pelo menos, oito dias. A pH 12,0 ocorre a degradação imediata dos compostos, com a formação dos respectivos conjugados na forma quinónica (conjugado da catecolamina o-quinona com a GSH). A pH próximo do pH fisiológico (pH=8), apesar de ocorrer a formação dos compostos acima referidos, essa degradação é mais lenta e retardada pela conservação das amostras a -80 °C. A pH $\leq 6,0$ comprovou-se a estabilidade dos aductos, apesar de ocorrer um ligeiro aumento da área dos picos dos monoconjugados após conservação das amostras 24 horas à temperatura ambiente. A pH $\leq 4,0$ comprovou-se a estabilidade destes compostos em meio ácido.

Deste modo, os resultados destes ensaios permitiram concluir que, após a recepção de amostras biológicas para detecção destes compostos, se deve efectuar imediatamente a acidificação das mesmas (precipitando o soro humano pela adição de PCA numa concentração final de 5% e recolhendo, por centrifugação, o sobrenadante para posterior análise), de modo a minimizar eventuais alterações de estabilidade dos compostos.

4.4.FASE IV – Desenvolvimento de uma metodologia para a extracção dos aductos das catecolaminas com a GSH

4.4.1 Optimização do processo de extracção

O processo de extracção utilizado no âmbito do presente trabalho experimental para a extracção e purificação dos aductos das catecolaminas com a GSH de amostras biológicas baseou-se no método de extracção das catecolaminas pela alumina descrito por diversos autores (214-222).

A alumina é um composto químico constituído por alumínio e oxigénio, Al_2O_3 , ou seja, óxido de alumínio. Na alumina, os iões hidroxilo coordenados de vários modos com catiões de alumínio constituem os grupos reactivos funcionais da

superfície do adsorvente. Kummert e Stumm (229) descreveram a adsorção pela alumina de vários compostos, nomeadamente ftalatos, salicilatos, benzoatos e catecóis. Estes autores notaram que a adsorção de ftalatos e salicilatos é dependente do pH, sendo favorecida em meio ácido. A adsorção dos catecóis, pelo contrário, aumenta com o aumento do pH (229).

O uso da alumina é referido por diversos autores como processo de extracção utilizado na determinação dos níveis plasmáticos de catecolaminas endógenas (214-222). A adsorção na alumina é útil para isolar e concentrar as catecolaminas presentes no plasma em baixas concentrações (na ordem dos nanomolar) (230), obtendo-se um baixo volume de extracto purificado adequado à injeção em HPLC. Este processo de adsorção na alumina apresenta, ainda, a grande vantagem de ser extremamente económico. Adicionalmente, a alumina activada pode ser regenerada quimicamente e reutilizada, assim que atingir a sua capacidade máxima de adsorção (neste trabalho experimental não se procedeu à reutilização deste adsorvente).

A determinação de catecolaminas é, geralmente, descrita usando a metodologia de HPLC com detector electroquímico (HPLC-ED), sendo de referir que a maioria dos métodos descritos na literatura empregam este procedimento extractivo para a purificação e extracção destes catecóis de amostras biológicas (215, 218, 219, 231, 232).

Durante a extracção, as catecolaminas são adsorvidas a pH alcalino pela alumina, de onde são libertadas por acidificação. A alumina, a pH alcalino, é lavada com água, para remover compostos interferentes. No final do ensaio, a alumina é acidificada e centrifugada, ficando as catecolaminas solubilizadas no ácido usado como solvente extractor. Seguidamente, uma alíquota do solvente usado na extracção é injectada no HPLC. Deste modo, a cromatografia líquida com detecção electroquímica após extracção das amostras pela alumina é um procedimento simples, económico e alternativo aos procedimentos radioenzimáticos para a quantificação de catecolaminas no plasma. Dado que a extracção pela alumina e a reacção electroquímica estão dependentes da presença de grupos hidroxilo presentes no anel catecol (218), esta técnica pôde ser usada para a detecção e quantificação dos aductos em estudo uma vez que,

após a conjugação das quinonas com a GSH, ocorre a regeneração do anel catecol. Com base neste conhecimento e no procedimento utilizado para a análise das catecolaminas biogénicas, procedeu-se à optimização do procedimento extractivo para poder ser utilizado na extracção de aductos resultantes da conjugação destes catecóis com a glutatona, com vista a eliminar a maioria dos interferentes presentes nas amostras biológicas, nomeadamente no soro humano. A optimização do processo teve em consideração os seguintes pontos:

- Avaliação de eventuais perdas de aductos durante o processo extractivo. Para o efeito, procedeu-se à análise por HPLC-ED do tampão de extracção Tris/EDTA após os 15 minutos de agitação, assim como das soluções de lavagem rejeitadas, de modo a averiguar as fases onde possivelmente ocorria a perda dos aductos.
- Concentração de EDTA no tampão Tris/EDTA. O EDTA é útil para criar as condições ideais para a adsorção das catecolaminas (e, consequentemente, dos seus aductos com a GSH) à alumina. Deste modo, testaram-se várias concentrações de EDTA no sentido de melhorar o processo de adsorção dos referidos aductos das catecolaminas com a GSH.
- Selecção do tipo e volume de solvente extractor. Foram, inicialmente, efectuados estudos com o objectivo de definir o volume e a concentração de PCA a usar na dessorção dos aductos (a pH ácido ocorre a libertação das catecolaminas e, consequentemente, dos correspondentes aductos da alumina). Foram, igualmente, testados outros solventes, que não o PCA, que permitissem uma mais eficiente recuperação dos aductos após a adsorção na alumina.
- Duração da agitação da amostra com a alumina, durante o processo de adsorção dos aductos.
- Avaliação do efeito da temperatura e ultra-sons na dessorção dos compostos.

De salientar que os estudos acima referidos foram realizados com o intuito de otimizar o processo extractivo. Deste modo, as condições testadas

que conduziram à extracção de uma menor quantidade de aductos foram rejeitadas de imediato e, por isso, o tratamento estatístico que foi apenas efectuado após a definição das condições optimizadas do método, isto é, durante a etapa de validação do método analítico.

4.4.1.1. Avaliação de eventuais perdas de aductos durante o processo extractivo

Após os primeiros estudos efectuados, em que se submeteram as misturas de reacção ao processo de extracção pela alumina, verificou-se que a eficácia da extracção dos aductos era inferior à eficácia da extracção das catecolaminas pelo mesmo método. No sentido de monitorizar o processo de extracção, averiguou-se a possível perda dos aductos ao longo das várias etapas do processo de extracção, nomeadamente:

- Após os 15 min de agitação com o tampão Tris/EDTA (testou-se a permanência de aductos neste tampão que, não sendo adsorvidos na alumina, seriam consequentemente eliminados com a rejeição deste tampão);
- Na primeira solução de lavagem (a primeira lavagem da alumina foi efectuada com 1 mL de água fria, a qual era posteriormente rejeitada; deste modo, avaliou-se a possível presença dos aductos nesta solução);
- Na segunda solução de lavagem (tal como na primeira lavagem da alumina, também a segunda foi efectuada com 1 mL de água fria que era posteriormente rejeitada; avaliou-se, também, a possível presença dos aductos nesta solução);
- Nos 500 μ L de água utilizados para transferir a alumina para o *eppendorf* com filtro.
- Após a rejeição dos 500 μ L de água, os aductos foram removidos da alumina com 200 μ L de PCA a 5%, solução essa analisada por injeção no HPLC.

Para o efeito, foram efectuadas misturas reaccionais em tampão contendo ADR e GSH, cujas concentrações finais foram de 4 μM e 0,5 mM, respectivamente (TP + ADR 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR). Uma dessas misturas não foi submetida ao processo de extracção pela alumina e foi directamente injectada no sistema de HPLC. A outra mistura foi submetida ao processo de extracção, ao longo do qual foram recolhidas alíquotas durante as etapas acima referidas. Foram, posteriormente, injectados no HPLC, nas mesmas condições cromatográficas, 20 μL da amostra extraída e não extraída, assim como das alíquotas recolhidas nas etapas acima referidas. Os cromatogramas foram obtidos por detecção electroquímica.

Para averiguar a permanência de aductos na alumina após a primeira adição de PCA a 5% foram, igualmente, efectuadas as 2ª e 3ª adições de 200 μL deste solvente, soluções essas igualmente injectadas e os respectivos cromatogramas, obtidos por detecção electroquímica, analisados no âmbito do presente estudo (Figura 4.25).

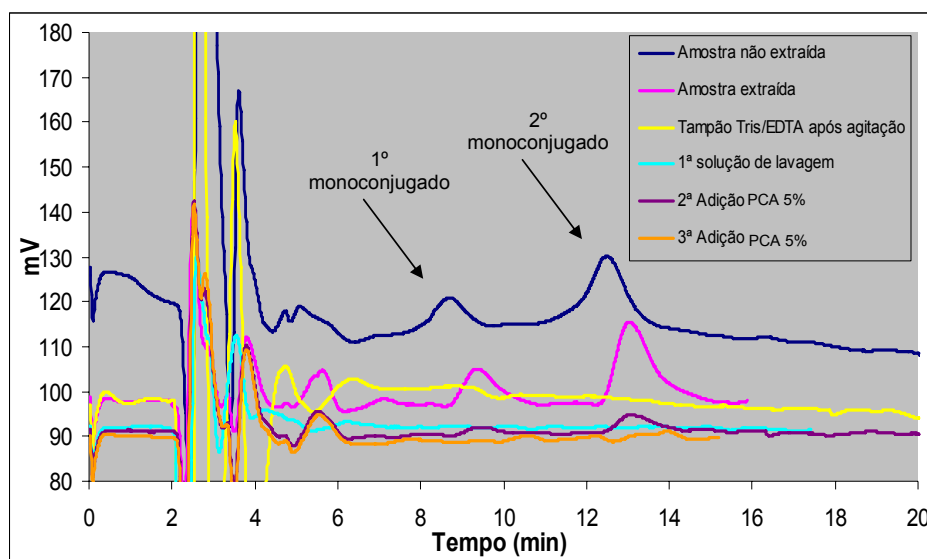


Figura 4.25 – Análise de eventuais perdas dos compostos durante o processo de extracção de uma amostra (TP + ADR 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR) pela alumina.

Pela análise da ~~Figura 4.25~~ ~~Figura 4.25~~ constatou-se que, durante o processo de extracção, não ocorrem perdas de aductos após a agitação das amostras com a alumina em tampão alcalino (~~Figura 4.25~~ ~~Figura 4.25~~, amarelo), nem ao longo da lavagem da alumina com água com o objectivo de eliminar os compostos não retidos (~~Figura 4.25~~ ~~Figura 4.25~~, turquesa). Os cromatogramas referentes à análise da segunda solução de lavagem e dos 500 µL usados para transferir a alumina para o *ependorf* com filtro (resultados não apresentados) foram iguais ao obtido após injeção da primeira solução de lavagem. Adicionalmente, após efectuar a segunda adição de PCA a 5% pelo filtro que contém a alumina foi, ainda, possível remover compostos (aductos) que permaneceram adsorvidos na alumina (~~Figura 4.25~~ ~~Figura 4.25~~, púrpura).

Desta forma constatou-se que não ocorrem perdas de aductos durante todo o processo de extracção (para as soluções de lavagem e para o tampão de agitação) mas sim que a dessorção destes compostos da alumina com o PCA a 5% não é completa.

4.4.1.2. Concentração de EDTA no tampão Tris/EDTA

4.4.1.2.1 Estudos com a adrenalina

Uma vez que o processo utilizado para extracção de aductos das catecolaminas com a GSH corresponde a uma adaptação do processo descrito na literatura para extracção de catecolaminas, foram inicialmente efectuados estudos com a adrenalina, com o objectivo de averiguar a eficácia deste processo de extracção.

Para o efeito, preparou-se uma solução de 5 µM de ADR em PCA a 5%, da qual 1000 µL foram submetidos ao referido processo de extracção. A ADR foi, posteriormente, removida da alumina pela adição de 200 µL de PCA a 5%. Para avaliar a eficácia do procedimento extractivo foi, também, preparada uma solução cinco vezes mais concentrada de ADR (25 µM) que foi injectada directamente no sistema de HPLC-ED numa alíquota de 20 µL. Esta comparação teve por base a redução de volume que ocorre ao recuperar a amostra em 200 µL de solvente

extractor. Se o procedimento extractivo apresentasse 100 % de eficácia então as áreas obtidas em ambos os cromatogramas (ADR 5 μ M após extracção e ADR 25 μ M sem extracção) seriam semelhantes. Quanto menor for a área do pico da amostra extraída, menor será a eficácia do processo extractivo.

Desta forma, procedeu-se à injeção de 20 μ L das seguintes soluções:

- Adrenalina 5 μ M em PCA a 5%, não sujeita ao processo de extracção;
- Adrenalina 5 μ M em PCA a 5%, sujeita ao processo de extracção com remoção da alumina pela adição de 200 μ L de PCA a 5% (o tampão utilizado na agitação com a alumina não continha EDTA);
- Adrenalina 25 μ M em PCA a 5%, não sujeita ao processo de extracção.
- Foi, igualmente, injectada uma alíquota dos 500 μ L de água, utilizados na transferência da alumina para o *ependorf* com filtro, com o objectivo de avaliar eventuais perdas de ADR para esta solução de transferência.

Obtiveram-se, por detecção electroquímica, os cromatogramas ilustrados na

[Figura 4.26](#) ~~Figura 4.26~~.

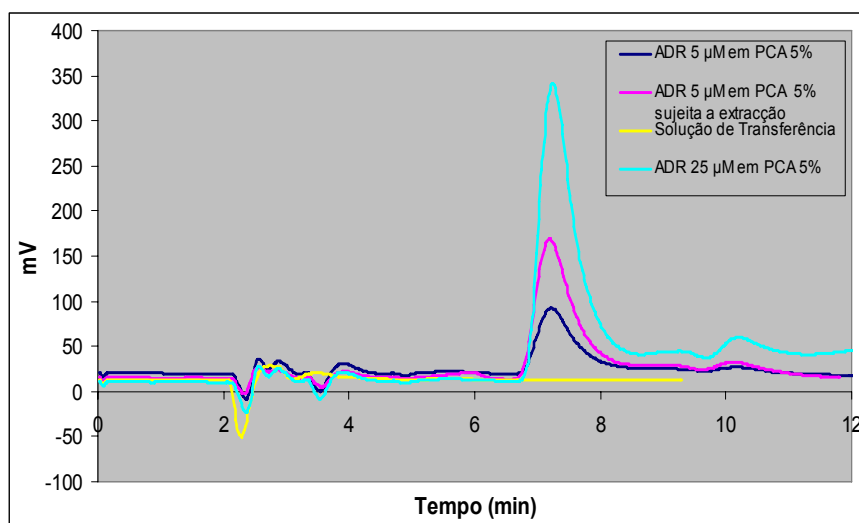


Figura 4.26 - Eficácia de extracção de uma amostra de adrenalina (5 μ M) em PCA a 5%.

Pela análise da [Figura 4.26](#) ~~Figura 4.26~~ foi possível constatar que o processo de extracção permitiu concentrar a amostra de ADR, uma vez que ocorreu um aumento da área do pico correspondente à amostra sujeita ao

processo de extracção comparativamente à amostra não extraída ([Figura 4.26](#)~~Figura 4.26~~, cromatogramas azul e rosa). Contudo, a extracção não apresenta uma eficácia de 100%, dada a diferença entre o pico obtido após injeção da amostra submetida a extracção e o pico obtido pela injeção da amostra de ADR 25 μM ([Figura 4.26](#)~~Figura 4.26~~, cromatogramas rosa e turquesa). Adicionalmente, verificou-se que não ocorreu perda de ADR para a solução usada na transferência da alumina para o *ependorf* com filtro ([Figura 4.26](#)~~Figura 4.26~~, cromatograma amarelo). Provavelmente, a baixa eficácia de extracção poderá dever-se ao facto do PCA não conseguir remover a totalidade da catecolamina adsorvida na alumina.

As áreas dos picos obtidos foram, posteriormente, integradas e encontram-se ilustradas na [Tabela 4.10](#)~~Tabela 4.10~~:

Tabela 4.10 - Áreas dos picos obtidos durante o estudo da eficácia de extracção de uma amostra de adrenalina (5 μM) em PCA a 5%.

Amostra	Área do Pico
Adrenalina 5 μM em PCA a 5%	2857215
Adrenalina 5 μM em PCA a 5% sujeita a extracção	6107670
Adrenalina 25 μM em PCA a 5%	12406030

Pela análise dos valores de áreas do pico da adrenalina ilustrados na [Tabela 4.10](#)~~Tabela 4.10~~ depreendeu-se que o valor da eficácia de extracção é de, aproximadamente, 50% (a área do pico obtido após extracção da amostra de ADR 5 μM correspondeu a cerca de metade do valor obtido para a amostra de ADR 25 μM).

Desta forma, efectuou-se um novo estudo de avaliação da eficácia da extracção da ADR, utilizando EDTA na solução de agitação com a alumina (Tampão Tris 1,5 M). No âmbito do presente estudo foram preparadas e injectadas (20 μL) as seguintes soluções:

- Adrenalina 0,1 μM em PCA a 5%, não sujeita ao processo de extracção;

- Adrenalina 0,1 μM em PCA a 5% sujeita ao processo de extracção (1000 μL) com remoção da alumina pela adição de 200 μL de PCA a 5% (o tampão Tris utilizado na agitação com a alumina não continha EDTA);
- Adrenalina 0,1 μM em PCA a 5% sujeita ao processo de extracção (1000 μL) com remoção da alumina pela adição de 200 μL de PCA a 5% (o tampão Tris utilizado na agitação com a alumina continha EDTA 15 mM);
- Adrenalina 0,5 μM em PCA a 5%, não sujeita ao processo de extracção (concentração cujo sinal do detector seria idêntico ao das amostras extraídas, admitindo 100% de extracção).

Após as respectivas injeções no sistema de HPLC, obtiveram-se, por detecção electroquímica, os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.27](#). As áreas dos picos obtidos foram, posteriormente, integradas e encontram-se ilustradas na [Tabela 4.11](#).

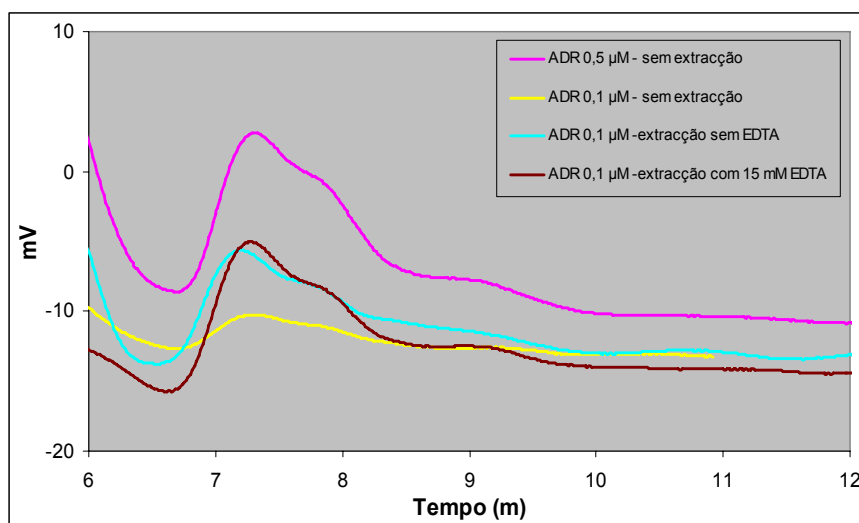


Figura 4.27 - Eficácia da extração de uma amostra de adrenalina (0,1 μM) em PCA a 5% (a baixa resolução dos picos deve-se ao facto de se utilizarem concentrações muito reduzidas de adrenalina).

Pela análise da [Figura 4.27](#) verificou-se que o processo de extração permitiu concentrar a amostra de ADR, uma vez que ocorreu um

aumento do tamanho do pico correspondente às amostras sujeitas ao processo de extracção, relativamente à amostra não extraída (~~Figura 4.27~~~~Figura 4.27~~, cromatogramas amarelo *versus* turquesa e púrpura). No entanto, a extracção não apresenta uma eficácia de 100%, dada a diferença entre o pico obtido após injeção das amostras submetidas a extracção e o pico obtido pela injeção da amostra de ADR 0,5 μM (~~Figura 4.27~~~~Figura 4.27~~, cromatogramas turquesa e púrpura *versus* rosa). Através deste estudo tornou-se evidente a melhoria da eficácia do processo de extracção quando se utiliza, durante a agitação com a alumina, um tampão Tris contendo EDTA (de salientar que o tampão Tris é utilizado no ajuste do pH ao valor óptimo de adsorção da alumina, pH: 8,2-8,6). Deste modo, verificou-se que a eficácia de adsorção da ADR é aumentada pela adição de EDTA ao tampão Tris (~~Figura 4.27~~~~Figura 4.27~~, cromatogramas turquesa *versus* púrpura).

Tabela 4.11 - Áreas dos picos obtidos durante o estudo da eficácia de extracção de uma amostra de 0,1 μM de adrenalina em PCA a 5%.

Amostra	Área do Pico
Adrenalina 0,1 μM em PCA a 5%	123689
ADR 0,1 μM em PCA a 5% - extracção sem EDTA no tampão Tris	374202
ADR 0,1 μM em PCA a 5% - extracção com 15 mM EDTA no tampão Tris	550257
Adrenalina 0,5 μM em PCA a 5%	631529

Pela análise dos valores de áreas do pico da adrenalina ilustrados na ~~Tabela 4.11~~~~Tabela 4.11~~ verificou-se que ocorre a concentração da amostra através deste processo de extracção e constatou-se a importância da presença de EDTA no tampão Tris de agitação com a alumina. Na presença de EDTA a eficácia de extracção aumentou para aproximadamente 87% (aumento este relevante face à eficácia de cerca de 50% obtida na ausência de EDTA).

4.4.1.2.2 Estudos com os aductos da adrenalina com a GSH

Os estudos efectuados com soluções de ADR submetidas ao processo de extracção pela alumina revelaram que a presença de EDTA no tampão de extracção Tris 1,5 M era importante para o processo de adsorção. Desta forma, tornou-se importante efectuar a avaliação da concentração ideal de EDTA neste tampão para a adsorção dos monoconjugados, tendo sido testados os aductos da ADR com a GSH.

Para o efeito, procedeu-se à preparação de misturas reaccionais de ADR e GSH (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR). Uma dessas misturas não foi submetida ao processo de extracção pela alumina. Para as restantes misturas procedeu-se à sua extracção mediante adsorção na alumina, diferenciando entre elas apenas na concentração de EDTA no tampão Tris/EDTA. As concentrações de EDTA testadas foram de 5, 15, 30, 60 e 100 mM. Após adsorção na alumina, os compostos foram recuperados pela adição de PCA a 5% (200 μ L). As amostras extraídas, assim como a amostra não extraída, foram injectadas (20 μ L) no sistema de HPLC-ED nas mesmas condições cromatográficas. Os cromatogramas foram obtidos por detecção electroquímica e encontram-se ilustrados na [Figura 4.28](#).

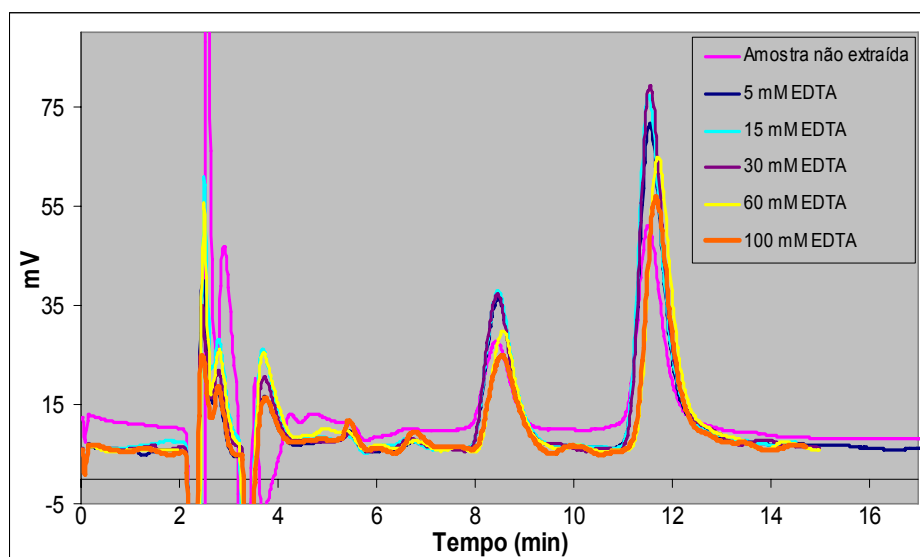


Figura 4.28 - Influência da concentração de EDTA presente no tampão de neutralização na eficácia do processo de extracção dos aductos da ADR com a GSH (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) pela alumina.

As áreas dos picos obtidos em cada cromatograma foram determinadas e são apresentadas na Tabela 4.12.

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Tabela 4.12 - Áreas dos picos obtidos durante o estudo da influência da concentração de EDTA (no tampão de extracção) na eficácia do processo de extracção dos aductos da ADR com a GSH (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).

Amostra	Área do Pico do 1º Monoconjugado	Área do Pico do 2º Monoconjugado
Amostra não extraída	6,50E+05	1,52E+06
5 mM EDTA	1,07E+06	2,40E+06
15 mM EDTA	1,17E+06	2,47E+06
30 mM EDTA	1,13E+06	2,49E+06
60 mM EDTA	8,51E+05	2,09E+06
100 mM EDTA	7,45E+05	1,82E+06

Mediante a análise da Figura 4.28 e da Tabela 4.12 foi possível verificar que as condições que permitiram a obtenção de melhores resultados, interpretados em termos de áreas de pico, correspondem à utilização de 15 e 30 mM de EDTA no tampão de extracção. Contudo, tal como se pode observar, estas duas condições são muito semelhantes em termos de eficácia de extracção (ausência de diferenças expressivas nos valores obtidos de áreas dos picos) pelo que se optou pela utilização de 15 mM de EDTA no tampão de extracção.

Desta forma, comparando os valores de áreas obtidos relativamente à amostra extraída sem EDTA e à amostra extraída na presença de EDTA no tampão de extracção, pode-se afirmar que o EDTA desempenha um importante papel no processo de adsorção dos monoconjugados na alumina.

4.4.1.3. Selecção do tipo e volume de solvente extractor

Tal como referido anteriormente, o método de extracção proposto no presente trabalho experimental corresponde a uma adaptação do método utilizado para a extracção de catecolaminas (215, 218, 219, 231, 232, 233). Um dos solventes extractores utilizados neste processo é o PCA (233). Com base no protocolo para a extracção de catecolaminas de amostras biológicas utilizado no Departamento de Farmacologia e Farmacoterapia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto utilizaram-se, inicialmente, 200 μ L de PCA a 5% como solvente para a extracção dos aductos das catecolaminas com a GSH.

Os estudos realizados para avaliar eventuais perdas de aductos durante o processo extractivo (4.4.1.1) revelaram que, mesmo após a primeira adição de solvente extractor era, ainda, possível remover aductos numa segunda adição de solvente. Nos referidos estudos constatou-se que era possível remover uma maior quantidade de aductos utilizando 300 μ L de PCA a 5% e que, mesmo aumentando o volume de solvente extractor, o método de extracção permitia, ainda, uma concentração da amostra (resultados não apresentados).

Seguidamente, procedeu-se à avaliação do efeito da concentração de PCA na eficácia do processo de extracção. Ou seja, foram usadas diferentes concentrações deste solvente extractor na remoção dos compostos da alumina (PCA a 5, 10 e 15%) de forma a estabelecer a concentração que permite a remoção de uma maior quantidade de aductos adsorvidos.

Para o efeito, efectuaram-se misturas reaccionais contendo uma concentração final de ADR e GSH de 4 μ M e 0,5 mM (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR). As misturas reaccionais foram sujeitas ao referido processo de extracção, diferindo entre elas na concentração de PCA usado como solvente extractor (300 μ L de PCA a 5%, 10% e 15%). Após extracção, 20 μ L de cada extracto foram injectados no equipamento de HPLC-ED com obtenção, por detecção electroquímica, dos respectivos cromatogramas ([Figura 4.29](#)[Figura 4.29](#)). Cada concentração de PCA foi testada em duplicado (na [Figura 4.29](#)[Figura 4.29](#) representou-se apenas o cromatograma de uma das réplicas). Foi, igualmente, injectada uma mistura reaccional não extraída para controlo da

extração e para comprovar a vantagem da utilização do referido processo extractivo.

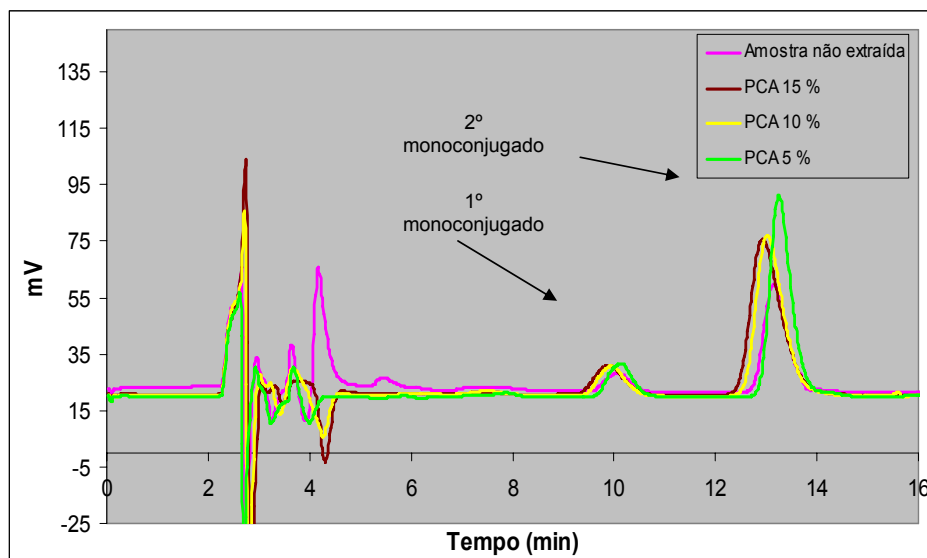


Figura 4.29 - Capacidade extractora do PCA em função da sua concentração (5%, 10% e 15%). Amostra extraída: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR.

Procedeu-se, de seguida, à análise dos cromatogramas obtidos e integraram-se as áreas dos picos detectados. Na ~~Tabela 4.13~~ **Tabela 4.13** representa-se o valor médio das áreas obtidas nas diferentes condições (média das duas réplicas injectadas).

Tabela 4.13 - Áreas dos picos obtidos durante o estudo da capacidade extractora do PCA em função da sua concentração (5%, 10% e 15%). Amostra extraída: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR.

Concentração de PCA	Área do Pico do 1º Monoconjugado	Área do Pico do 2º Monoconjugado
Amostra não extraída	2,14E+05 \pm 3,15E+03	1,26E+06 \pm 2,90E+04
5%	3,74E+05 \pm 1,53 E+03	2,11E+06 \pm 6,60E+04
10%	3,75E+05 \pm 1,15 E+03	2,20E+06 \pm 6,50E+04
15%	3,82E+05 \pm 1,07 E+03	2,30E+06 \pm 1,29E+04

CV (%) (amostras extraídas)	1,16	4,31
--------------------------------	------	------

Pela análise da ~~Tabela 4.13~~ ~~Tabela 4.13~~ foi notória a capacidade de concentração das amostras recorrendo ao presente método de extracção (aumento das áreas dos picos das amostras extraídas comparativamente com a amostra não sujeita ao processo de extracção).

Da análise da referida tabela, embora não tratada estatisticamente, verificou-se a ausência de diferenças relevantes nos valores médios de área dos picos obtidos para as três concentrações de PCA testadas, ausência essa comprovada pelos baixos coeficientes de variação obtidos ($CV < 10\%$).

Adicionalmente, apesar das concentrações de 10 e 15% apresentarem um valor ligeiramente superior de área dos picos, a sua utilização provocou, tal como se pode verificar na ~~Figura 4.29~~ ~~Figura 4.29~~, um alargamento dos picos. Por este motivo, rejeitou-se a possibilidade de utilização destas concentrações na extracção dos aductos, uma vez que essa utilização tem como consequência uma menor resolução dos picos correspondentes. Deste modo, optou-se por definir a concentração de 5% como a concentração de PCA a utilizar na extracção dos aductos das catecolaminas com a GSH de amostras biológicas.

Com o objectivo de averiguar a existência de aductos ainda adsorvidos na alumina após a extracção das amostras acima referidas efectuou-se uma segunda adição de PCA a 5, 10 e 15% (150 μ L) ao filtro contendo a alumina utilizada na extracção das referidas amostras. Após injeccção de 20 μ L do solvente correspondente à segunda adição de solvente à alumina obtiveram-se os cromatogramas ilustrados na ~~Figura 4.30~~ ~~Figura 4.30~~

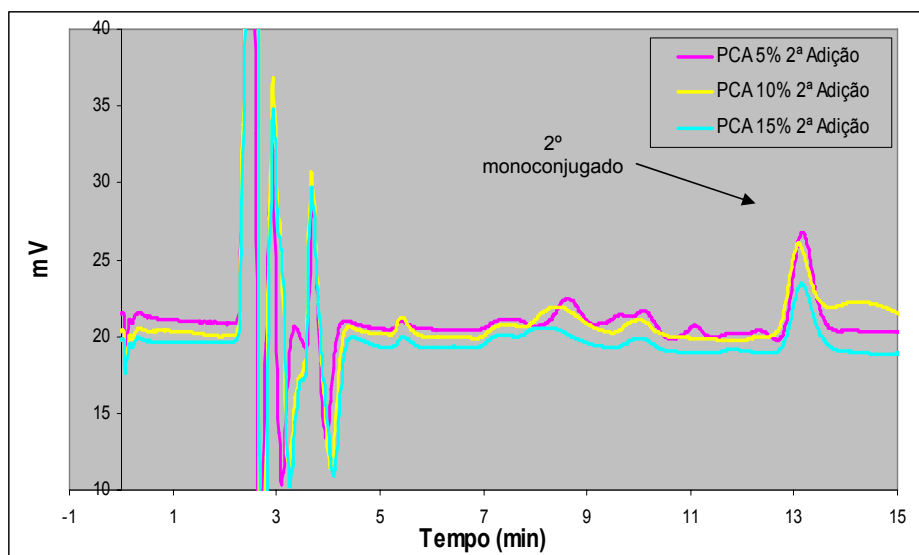


Figura 4.30 - Capacidade extractora do PCA em função da sua concentração (5%, 10% e 15%) – segunda adição de 150 µL PCA pelo filtro com a alumina utilizada na extracção de uma amostra (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).

Pela análise da [Figura 4.30](#) tornou-se evidente, uma vez mais, que a primeira adição de PCA, independentemente da sua concentração, não é suficiente para remover a totalidade dos aductos adsorvidos pela alumina. Contudo, o uso de um maior volume de PCA para remover a totalidade dos aductos levaria igualmente a uma diluição da amostra. Por este motivo optou-se pela utilização de apenas 300 µL de PCA, volume este que permite ainda concentrar a amostra.

No âmbito do presente estudo procedeu-se, igualmente, ao estudo da possibilidade de realizar uma extracção fraccionada, perfazendo o volume final de 300 µL de solvente extractor. Deste modo, foram efectuadas misturas reaccionais cuja concentração de ADR e GSH era de 4 µM e 0,5 mM, respectivamente (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR). Estas amostras foram submetidas ao processo de extracção, diferindo entre elas na forma como a remoção dos aductos foi efectuada com o solvente extractor (PCA a 5%). Deste modo, foram testadas as seguintes condições:

- 300 µL PCA a 5%

- 2*150 μL PCA a 5%
- 3*100 μL PCA a 5%

Procedeu-se, de seguida, à injeção, nas mesmas condições cromatográficas, de 20 μL de cada amostra, assim como de uma amostra não sujeita ao referido processo de extracção, obtendo-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.31](#)~~Figura 4.34~~. Para cada situação testada, a amostra foi analisada em duplicado, encontrando-se apenas representado o cromatograma de uma das réplicas.

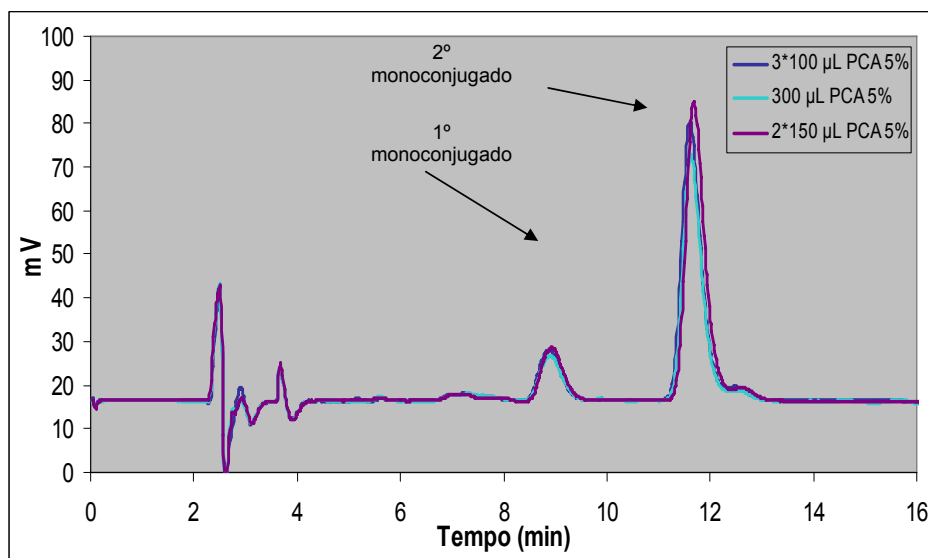


Figura 4.31 - Efeito do fraccionamento do volume de PCA a 5% (300 μL) utilizado na extracção de uma amostra (TP + ADR 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR) em mais do que uma adição (300 μL , 2*150 μL e 3*100 μL) na eficácia do processo extractivo.

Os cromatogramas obtidos por detecção electroquímica foram analisados e integradas as áreas dos picos detectados. Na [Tabela 4.14](#)~~Tabela 4.14~~ representa-se o valor médio das áreas obtidas em cada condição (valor médio de duas réplicas).

Tabela 4.14 - Áreas dos picos obtidos durante o estudo da possibilidade de fraccionamento do volume de PCA a 5% (300 µL) utilizado na extracção de uma mistura reaccional (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) em mais do que uma adição (300 µL, 2*150 µL e 3*100 µL).

Condição	Área do Pico do 1º Monoconjugado	Área do Pico do 2º Monoconjugado
300 µL PCA a 5%	2,91E+05 ± 4,38E+03	1,57E+06 ± 6,05E+04
2*150 µL PCA a 5%	3,58E+05 ± 4,72E+03	1,87E+06 ± 5,57E+03
3*100 µL PCA a 5%	3,20E+05 ± 3,94E+03	1,61E+06 ± 6,27E+04

A ~~Tabela 4.14~~Tabela 4.14, apesar de não tratada estatisticamente, indicou que o fraccionamento do volume do solvente extractor em mais do que uma adição permite aumentar a eficácia do processo de extracção. De facto, observou-se uma maior quantidade de compostos extraídos (maior área dos picos) quando se efectuou a divisão do solvente extractor em 2 ou 3 passagens, reunindo o volume total de extracção. Deste modo, optou-se pelo fraccionamento do volume de solvente extractor em duas adições de 150µL (2*150 µL), pela maior simplicidade do processo.

Pelo filtro contendo a alumina utilizada na extracção das amostras acima referidas efectuou-se uma nova adição de 150 µL de PCA a 5%, o qual foi injectado no HPLC obtendo-se os cromatogramas ilustrados na ~~Figura 4.32~~Figura 4.32.

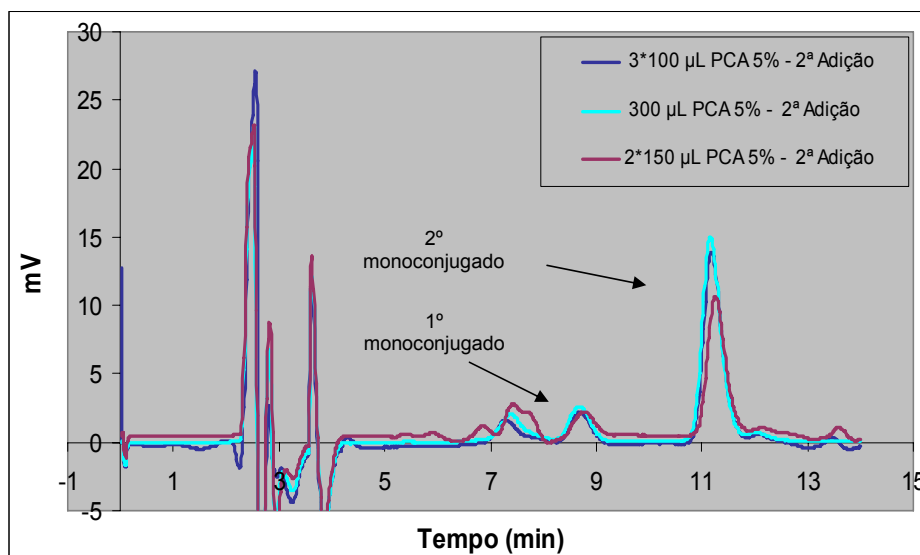


Figura 4.32 - Efeito do fraccionamento do volume de PCA a 5% (300 µL) utilizado na extração de uma amostra (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) em mais do que uma adição (300 µL, 2*150 µL e 3*100 µL) na eficácia do processo extractivo após segunda adição de 150 µL PCA pelo filtro com a alumina utilizada na extração de uma amostra.

Pela análise da [Figura 4.32](#) verificou-se que, embora a eficácia do processo extractivo aumente quando se fracciona o solvente extractor, existem ainda aductos adsorvidos na alumina após esta extração. No entanto, o protocolo extractivo com recurso a duas adições sucessivas de 150 µL de PCA a 5% foi o que proporcionou maiores recuperações dos aductos.

A existência de artigos científicos que reportam a utilização do ácido acético na remoção de catecolaminas adsorvidas na alumina (218) levou à realização de estudos com o principal objectivo de avaliar a capacidade extractora deste ácido comparativamente ao PCA a 5%. Deste modo, foram preparadas soluções de diferentes concentrações deste ácido e, para o efeito, apenas foram testadas as soluções de pH idêntico ao do PCA a 5% (pH <1) isto é, as soluções de concentração 50, 70 e 100% de ácido acético. Após a preparação de diferentes misturas de reacção (TP + ADR 4µM + GSH 0,5 mM + TIR), as amostras foram submetidas ao processo de extração, diferindo entre elas apenas no tipo de solvente utilizado para remover os compostos da alumina (PCA a 5%, ácido

acético a 50, 70 e 100%). Procedeu-se, de seguida, à injeção, nas mesmas condições cromatográficas, de 20 μL de cada amostra e os respectivos cromatogramas foram obtidos por detecção electroquímica ([Figura 4.33](#)[Figura 4.33](#)).

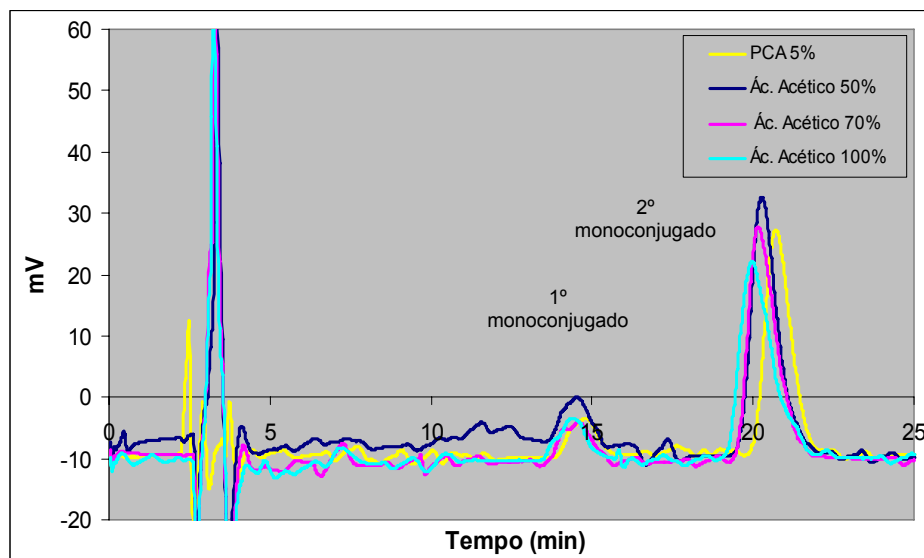


Figura 4.33 - Capacidade extractora do ácido acético em função da sua concentração (50, 70 e 100%). Amostra extraída: TP + ADR 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR.

As áreas dos picos detectados em cada cromatograma foram integradas e encontram-se ilustradas na [Tabela 4.15](#)[Tabela 4.15](#).

Tabela 4.15 - Áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da capacidade extractora do ácido acético (50, 70 e 100%).

Amostra extraída: TP + ADR 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR.

Condições	Área Pico do 1º Monoconjugado	Área Pico do 2º Monoconjugado
300 μL Ácido Acético a 50%	4,56E+05	2,40E+06
300 μL Ácido Acético a 70%	4,98E+05	2,29E+06
300 μL Ácido Acético a 100%	3,44E+05	2,20E+06

300 µl PCA a 5%	3,51E+05	2,02E+06
-----------------	----------	----------

Pela análise da [Figura 4.33](#) e da [Tabela 4.15](#) foi possível constatar a notória capacidade extractora do ácido acético, nomeadamente na concentração de 50%, permitindo a remoção de quantidades de compostos idênticas, ou mesmo superiores às quantidades extraídas pela adição de PCA a 5%. No entanto, verificou-se posteriormente que a estabilidade dos aductos neste ácido era inferior à existente na presença do PCA a 5% (resultados não apresentados). Deste modo, optou-se por continuar com a utilização de PCA a 5% na extracção dos aductos.

A eficácia de outros solventes (metanol, fase móvel sem metanol, PCA a 5% saturado com alumínio, PCA a 5% saturado com ditionito de sódio, entre outros) na remoção dos aductos da ADR com a GSH da alumina foi igualmente testada mas, os resultados obtidos, levaram à rejeição da sua possível utilização, dada a baixa eficácia extractora demonstrada.

Os estudos acima referidos efectuados no sentido de selecção do tipo e volume de solvente extractor foram, igualmente, efectuados utilizando a NA e a DA como catecolaminas intervenientes na formação dos aductos com a GSH.

No caso particular da NA foram efectuadas 5 misturas reaccionais (TP + NA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR), em que uma delas não foi sujeita ao processo de extracção pela alumina e as restantes extraídas pelo referido processo, diferindo apenas na etapa final de dessorção dos compostos. Deste modo foram consideradas as seguintes condições:

- Dessorção com 300 µL PCA a 5%
- Dessorção com 2*150 µL PCA a 5%
- Dessorção com 2*150 µL PCA a 5% com ditionito de sódio
- Dessorção com 2*150 µL fase móvel

A utilização de fase móvel e PCA saturado com ditionito de sódio teve por base a consulta bibliográfica de publicações que referiam a utilização destes solventes na extracção de catecolaminas pela presente metodologia (234, 235). As amostras foram, posteriormente, injectadas (20 µL) no sistema de HPLC-ED,

nas mesmas condições cromatográficas, e os respectivos cromatogramas foram obtidos por detecção electroquímica ([Figura 4.34](#)~~Figura 4.34~~).

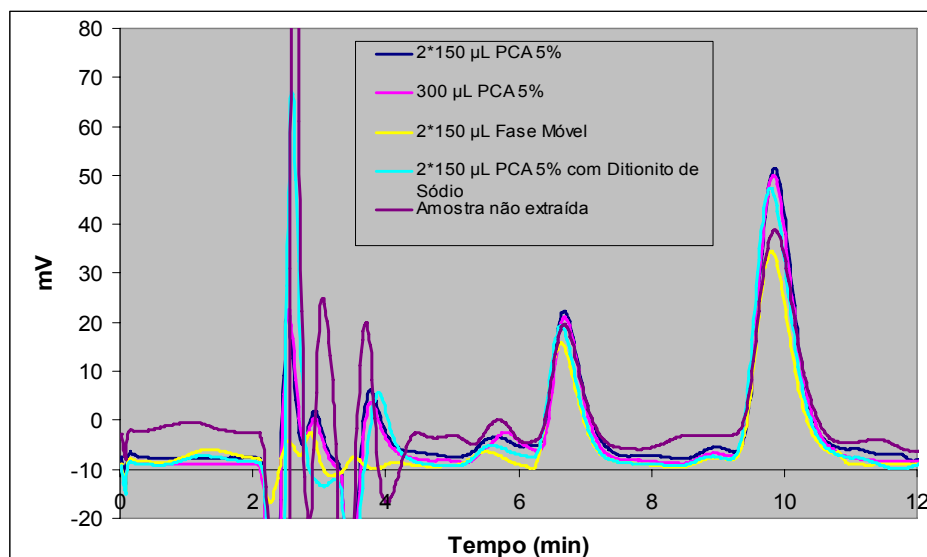


Figura 4.34 – Efeito do tipo e volume de solvente extractor na eficácia do processo extractivo. Amostra extraída: TP + NA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR.

Após análise dos cromatogramas obtidos procedeu-se à integração das áreas dos picos detectados as quais se encontram ilustradas na [Tabela 4.16](#)~~Tabela 4.16~~.

Tabela 4.16 - Áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos, por detecção electroquímica, durante o estudo da selecção do tipo e volume de solvente extractor. Amostra extraída: TP + NA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR.

Condições	Área Pico do 1º Monoconjugado	Área Pico do 2º Monoconjugado
Amostra não extraída	7,15E+05	1,63E+06
300 µL PCA a 5%	7,38E+05	2,08E+06
2*150 µL PCA a 5%	7,85E+05	2,03E+06
2*150 µL Fase Móvel	7,57E+05	1,51E+06

2*150 µL PCA a 5% com ditionito de sódio	7,75E+05	2,03E+06
--	----------	----------

Pela análise da [Figura 4.34](#) e da [Tabela 4.16](#) foi possível constatar que os dois novos solventes extractores testados não apresentam vantagens relativamente ao PCA, dadas as menores áreas dos picos detectados nos cromatogramas.

Ainda no âmbito do presente estudo foram avaliadas as capacidades extractoras de outros solventes nomeadamente, PCA a 5% com o valor de pH ajustado a 2,0 (mediante adição de NaOH 0,1N), mistura de PCA a 5% e metanol (3:1) e PCA a 5% saturado com alumínio. Para o efeito, foram preparadas misturas reaccionais (TP + NA 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR), tendo sido consideradas as seguintes condições de ensaio:

- Amostra não extraída
- Dessorção com 2*150 µL de PCA a 5%
- Dessorção com 3*100 µL de PCA a 5%
- Dessorção com 2*150 µL de uma mistura de PCA a 5% e metanol (3:1)
- Dessorção com 2* 150 µL de PCA a 5% (pH=2,0)
- Dessorção com 5*150 µL de PCA a 5% (esta situação origina um volume final de 750 µL que corresponde ao volume inicial de amostra sujeita ao processo de extracção; desta forma pretendeu-se avaliar as perdas do processo extractivo uma vez que, perante 100% de extracção, o sinal detectado perante esta amostra seria idêntico ao sinal obtido pela injeção da amostra não extraída).

As amostras foram, posteriormente, injectadas (20 µL) no sistema de HPLC-ED, nas mesmas condições cromatográficas, os respectivos cromatogramas foram obtidos por detecção electroquímica ([Figura 4.35](#)).

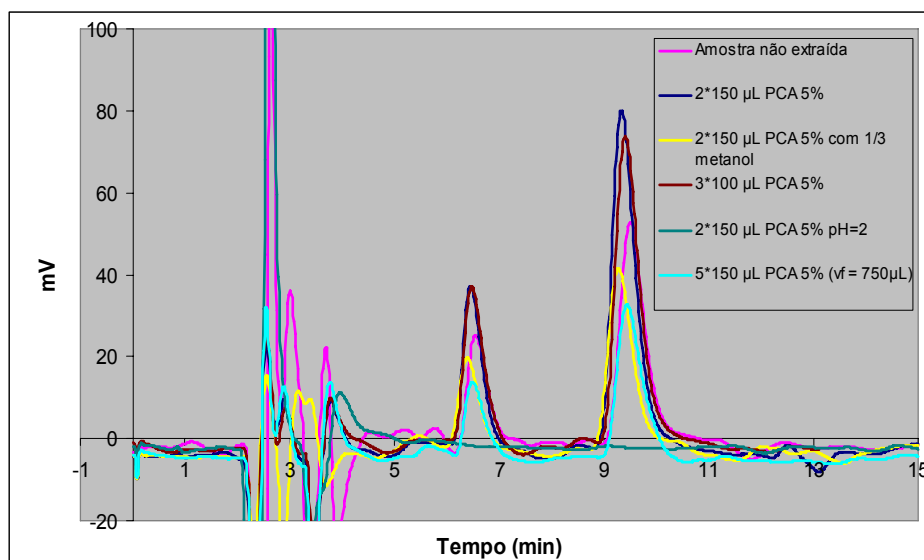


Figura 4.35 - Efeito do tipo e volume de solvente extractor na eficácia do processo extractivo. Amostra extraída: TP + NA 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR.

As áreas dos picos obtidos foram integradas e encontram-se ilustradas na [Tabela 4.17](#).

Tabela 4.17 - Áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos, por detecção electroquímica, durante o estudo da selecção do tipo e volume de solvente extractor para os aductos da noradrenalina e a GSH. Amostra extraída: TP + NA 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR.

Condições	Área Pico do 1º Monoconjugado	Área Pico do 2º Monoconjugado
Amostra não extraída	7,13E+05	1,73E+06
2*150 μ L PCA a 5%	9,55E+05	2,53E+06
2*150 μ L mistura de PCA a 5% e metanol (3:1)	5,67E+05	1,39E+06
3*100 μ L PCA a 5%	9,61E+05	2,33E+06
2*150 μ L PCA a 5% (pH=2,0)	-	-
5*150 μ L PCA a 5% (volume final = 750 μ L)	4,60E+05	1,30E+06

Pela análise da ~~Figura 4.35~~ Figura 4.35 e da ~~Tabela 4.17~~ Tabela 4.17 verificou-se que a utilização de metanol reduz a capacidade extractora do PCA e, mais uma vez, é possível definir a extracção fraccionada em duas adições de solvente extractor (PCA a 5%) como a melhor estratégia de extracção dos compostos adsorvidos na alumina. Adicionalmente, mediante a comparação dos resultados obtidos através da injeção da amostra não extraída e da amostra sujeita a extracção com um volume de solvente extractor igual ao volume inicial de amostra (750 μL) é possível comprovar, mais uma vez, que a eficácia do processo de extracção não se aproxima dos 100%. Esta menor eficácia de extracção poderá ser explicada pelo facto de o PCA não remover a totalidade dos compostos adsorvidos na alumina, facto comprovado pela detecção dos compostos após nova adição de PCA à alumina usada no processo de extracção (~~Figura 4.36~~ Figura 4.36).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Contudo, o resultado mais interessante do presente estudo relaciona-se com o facto de a alteração do valor de pH do PCA a 5% para um valor de 2 ter originado a inibição total da sua capacidade extractora, uma vez que não permitiu a extracção dos compostos (ausência de picos no respectivo cromatograma). Deste modo, pelo filtro usado na extracção da referida amostra foi efectuada uma segunda adição solvente extractor mas, desta vez, recorrendo a 300 μL de PCA a 5% sem alteração do valor de pH. Efectuou-se, igualmente, uma nova adição de 150 μL de PCA a 5% ao filtro usado na extracção da amostra que foi submetida à adição de 5*150 μL de PCA a 5%. Após injeção no sistema de HPLC-ED de 20 μL dos dois extractos obtidos nesta nova adição de solvente foi possível obter os cromatogramas ilustrados na ~~Figura 4.36~~ Figura 4.36 (para permitir uma melhor comparação dos resultados apresentam-se igualmente os cromatogramas da amostra não extraída e da amostra extraída mediante adição de 2*150 μL de PCA a 5%).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

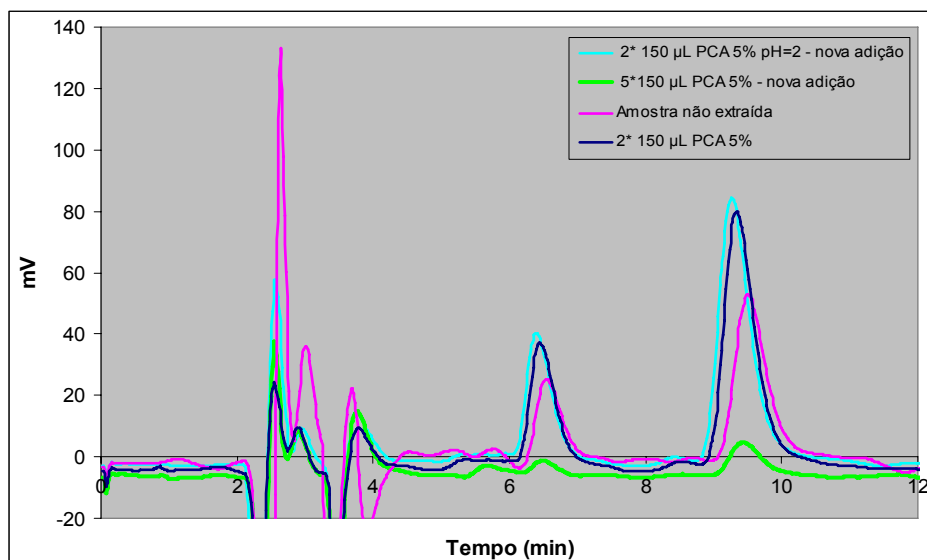


Figura 4.36 - Efeito do tipo e volume de solvente extractor na eficácia do processo extractivo – segunda adição de PCA a 5% pelo filtro com a alumina utilizada na extracção de uma amostra (TP + NA 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).

Pela análise da ~~Figura 4.36~~ **Figura 4.36** foi possível comprovar que a utilização inicial de PCA a 5% pH=2 não destruiu os aductos adsorvidos na alumina, uma vez que a segunda adição de 300 μ L de PCA (sem alteração de pH e, portanto, pH <1) permitiu a obtenção de um cromatograma idêntico ao obtido com a amostra extraída com 2*150 μ L de PCA a 5%. Deste modo, comprova-se que a alteração do valor de pH do PCA a 5% levou à inibição da sua capacidade extractora, não causando a destruição dos compostos adsorvidos na alumina. Adicionalmente, é possível verificar que, mesmo após a extracção com 5*150 μ L de PCA a 5% é, ainda, possível remover os aductos adsorvidos na alumina.

Estes estudos efectuados no âmbito da selecção do tipo e volume de solvente extractor foram, também, efectuados utilizando misturas reaccionais com DA como catecolamina interveniente na formação dos aductos com a GSH. Para o efeito, foram preparadas misturas reaccionais (TP + DA 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR), tendo sido consideradas 4 condições de ensaio diferentes:

- Amostra não extraída
- Dessorção com 2*150 μ L PCA a 5%

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

- Dessorção com 300 μL PCA a 5%
- Dessorção com 2*150 μL fase móvel

Após injeção (20 μL) das amostras acima referidas no sistema de HPLC obtiveram-se, por detecção electroquímica, os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.37](#).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

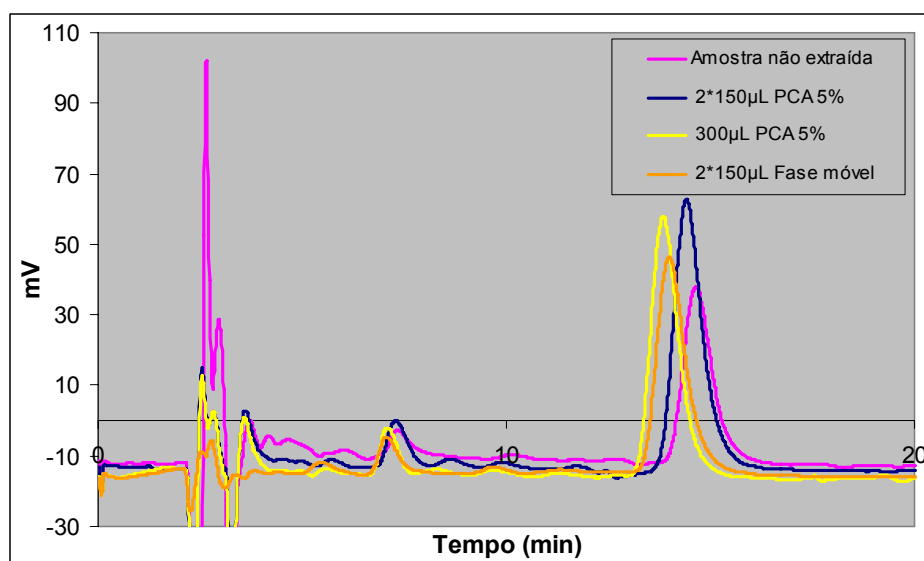


Figura 4.37 - Efeito do tipo e volume de solvente extractor na eficácia do processo extractivo dos aductos da dopamina e GSH (TP + DA 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR).

Pela análise da [Figura 4.37](#) foi possível constatar, mais uma vez, que a fase móvel de trabalho não se constitui como um solvente adequado à extracção das amostras. Pelo contrário, comprova-se novamente que a utilização de PCA a 5% e a sua subdivisão em duas adições são processos a adoptar na extracção dos monoconjugados da DA com a GSH.

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Em conclusão, os resultados obtidos nos estudos efectuados com misturas reaccionais contendo diferentes catecolaminas (ADR, NA e DA) permitiram a obtenção de resultados idênticos para os respectivos monoconjugados com a GSH.

4.4.1.4. Duração da agitação da amostra com a alumina

No sentido de otimizar o processo de extracção, um dos parâmetros avaliados foi o tempo de agitação da amostra com a alumina na presença de tampão Tris/EDTA. Para o efeito, foram preparadas misturas reaccionais contendo uma concentração final de ADR de 4 μM (TP + ADR 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR), que foram, posteriormente, submetidas ao processo de extracção com diferentes tempos de agitação (30 s e 5, 10, 15, 25 e 35 min). Após a referida agitação com a alumina, as restantes etapas do processo de extracção foram idênticas para todas as amostras extraídas (os compostos foram removidos da alumina pela adição de 2*150 μL PCA a 5%). Por último, procedeu-se à injeção de 20 μL de cada amostra no sistema de HPLC-ED, nas mesmas condições cromatográficas. Os cromatogramas foram obtidos por detecção electroquímica e encontram-se ilustrados na [Figura 4.38](#).

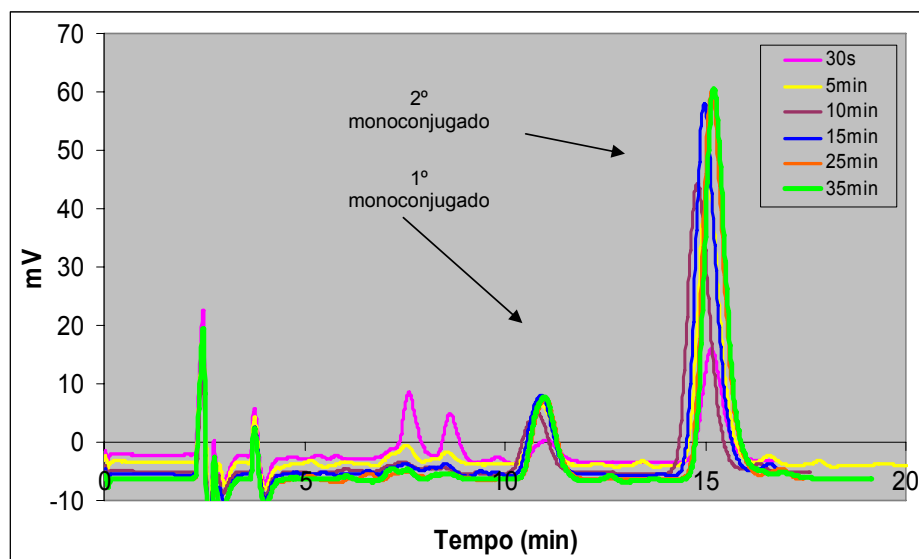


Figura 4.38 - Influência do tempo de agitação (30 s; 5, 10, 15, 25 e 35 min) da amostra (TP + ADR 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR) com a alumina na eficácia do processo de extracção.

Pela análise da [Figura 4.38](#), depreendeu-se a necessidade de um período mínimo de contacto entre a amostra e alumina uma vez que, 30

segundos de contacto apenas permite extrair uma pequena quantidade de aductos (rosa). Para todas as situações acima ilustradas, os dois picos dos monoconjugados obtidos em cada cromatograma foram avaliados e integradas as respectivas áreas, as quais se encontram ilustradas na [Tabela 4.18](#).

Tabela 4.18 - Áreas dos picos obtidos durante o estudo da influência do tempo de agitação da amostra (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) com a alumina na eficácia do processo de extracção pela alumina.

Tempo de Agitação	Área do Pico do 1º Monoconjugado	Área do Pico do 2º Monoconjugado
30 s	1,49E+05	6,98E+05
5 min	3,81E+05	1,84E+06
10 min	3,92E+05	1,88E+06
15 min	5,04E+05	2,31E+06
25 min	5,01E+05	2,48E+06
35 min	5,25E+05	2,43E+06

Pela análise da [Tabela 4.18](#) foi possível observar a necessidade de efectuar a extracção destes compostos recorrendo a uma agitação pela alumina por um período de tempo nunca inferior a 15 minutos. De facto, as áreas obtidas nos cromatogramas correspondentes a 5 e 10 minutos de agitação são consideravelmente inferiores às obtidas no cromatograma correspondente a 15 minutos de agitação. Pelo contrário, o aumento do tempo de agitação com a alumina para valores superiores a 15 minutos não parece apresentar aumentos relevantes das áreas dos picos obtidos e, por este motivo, optou-se por manter o período de 15 minutos como o período de tempo adequado para a agitação das amostras com a alumina. Além disso, dado que o aumento do tempo de agitação para além dos 15 minutos não aumenta consideravelmente a eficácia da extracção, não se torna necessário submeter as amostras, por um período mais prolongado, a um valor de pH alcalino que poderia afectar a estabilidade dos aductos. Tal como já discutido no estudo da estabilidade destes compostos a pH 8,0, essa estabilidade está garantida por um período de tempo

de 25 minutos e, assumindo 15 minutos como o tempo ideal de agitação, diminuiu-se o risco de uma possível degradação dos compostos.

4.4.1.5. Avaliação do efeito da temperatura e Ultra-sons na dessorção dos compostos

Tal como foi já referido, os estudos efectuados no sentido de avaliar a eficácia do processo de extracção de aductos das catecolaminas com a GSH revelaram a presença de aductos retidos na alumina após a extracção com 300 μ L de PCA a 5%. Deste modo, pretendeu-se avaliar se o aumento da temperatura contribuía, ou não, para facilitar a libertação dos compostos do adsorvente aumentando, deste modo, a sua concentração no solvente extractor. Com este objectivo de avaliar o efeito da temperatura na dessorção dos compostos da alumina, foram efectuadas misturas reaccionais cujas concentrações finais de NA e GSH foram de 4 μ M e 0,5 mM, respectivamente (TP + NA 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR). Uma das misturas reaccionais não sofreu extracção pela alumina, enquanto que as restantes foram submetidas ao processo de extracção, diferindo entre elas apenas na etapa final de dessorção dos compostos com o solvente extractor. Foram testadas as seguintes condições:

- remoção com 300 μ L de PCA a 5% de acordo com o protocolo estabelecido na [Figura 3.2](#)~~Figura 3.2~~;
- adição de 300 μ L de PCA a 5%, agitação de 10 min a 30°C e centrifugação;
- adição de 300 μ L de PCA a 5%, agitação de 10 min a 40°C e centrifugação;
- adição de 300 μ L de PCA a 5%, agitação de 10 min a 60°C e centrifugação;

As amostras foram, posteriormente, injectadas no HPLC (20 μ L) nas mesmas condições cromatográficas com obtenção, por detecção electroquímica, dos cromatogramas ilustrados na [Figura 4.39](#)~~Figura 4.39~~.

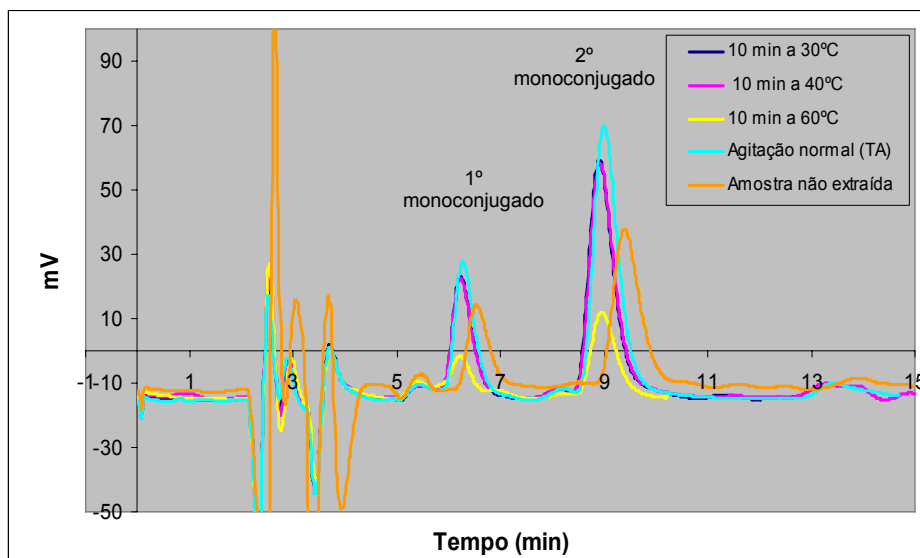


Figura 4.39 - Efeito da temperatura no processo de dessorção dos aductos da NA com a GSH (TP + NA 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).

Pela análise da [Figura 4.39](#) verificou-se que a melhor eficácia de extracção é alcançada nas condições normais de dessorção à temperatura ambiente. Adicionalmente, verifica-se que a 60 °C ocorre a provável degradação dos compostos, uma vez que a quantidade detectada é bastante inferior à presente na amostra não extraída. Deste modo, o aumento da temperatura não se constitui como uma estratégia de aumento da eficácia do processo de extracção.

Também na tentativa de aumentar a quantidade de compostos extraídos foi testada a possibilidade da utilização dos ultra-sons durante o período de contacto com o solvente extractor. Nesta estratégia recorreu-se ao contacto das amostras com sonda de ultra-sons ou à imersão das amostras em banho de ultra-sons no sentido de contribuir para o aumento da capacidade extractora do PCA a 5%.

Deste modo, foram efectuadas misturas reaccionais em tampão fosfato cujas concentrações finais de ADR e GSH eram de 4 μ M e 0,5 mM, respectivamente (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR). Uma das misturas não foi extraída e as restantes submetidas ao processo de extracção pela alumina diferindo, uma vez mais, apenas na etapa final de dessorção dos compostos com o solvente extractor. Neste sentido, foram testadas as seguintes condições experimentais:

- remoção com 300 μ L de PCA a 5% de acordo com o protocolo estabelecido em 3.4;
- adição de 300 μ L de PCA a 5%, 12 s de contacto com sonda de ultra-sons e centrifugação;
- adição de 300 μ L de PCA a 5%, 60 s de contacto com sonda de ultra-sons e centrifugação;
- adição de 300 μ L de PCA a 5%, 60 s de imersão em banho de ultra-sons e centrifugação;
- adição de 300 μ L de PCA a 5%, 120 s de imersão em banho de ultra-sons e centrifugação;
- adição de 300 μ L de PCA a 5%, 10 min de imersão em banho de ultra-sons e centrifugação;

As amostras foram, posteriormente, injectadas no sistema de HPLC-ED (20 μ L) nas mesmas condições cromatográficas com obtenção, por detecção electroquímica, dos cromatogramas ilustrados na [Figura 4.40](#) ~~Figura 4.40~~.

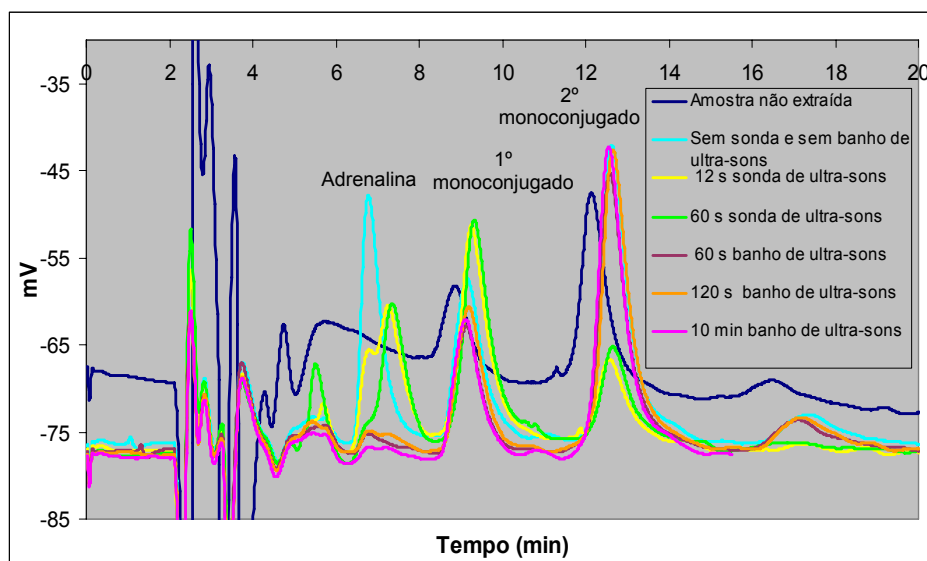


Figura 4.40 - Efeito do contacto com sonda de ultra-sons e da imersão em banho de ultra-sons no processo de dessorção dos aductos da ADR com a GSH (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).

As áreas dos picos obtidos em cada cromatograma foram integradas e encontram-se ilustradas na [Tabela 4.19](#).

Tabela 4.19 - Áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo do efeito do contacto com sonda de ultra-sons e da imersão em banho de ultra-sons no processo de dessorção. Amostras extraídas: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR.

Condições	Área Pico do 1º Monoconjugado	Área Pico do 2º Monoconjugado
Amostra não extraída	3,51E+05	9,36E+05
Extracção sem contacto com sonda de ultra-sons e sem imersão em banho de ultra-sons	8,13E+05	1,60E+06
12 s de contacto com sonda ultra-sons	1,10E+06	4,02E+05
60 s de contacto com sonda ultra-sons	1,03E+06	4,82E+05
60 s de imersão em banho de ultra-sons	5,97E+05	1,48E+06
120 s de imersão em banho de ultra-sons	6,87E+05	1,62E+06
10 min de imersão em banho de ultra-sons	6,78E+05	1,71E+06

Pela análise da [Figura 4.40](#) e da tabela contendo as áreas dos picos detectados ([Tabela 4.19](#)) foi possível constatar que o processo de contacto com sonda de ultra-sons leva a uma diminuição acentuada da quantidade detectada de 2º monoconjugado. De facto, essa quantidade é cerca de metade da detectada na amostra não extraída, indiciando a possível degradação destes compostos pelo processo de sonicação. Contudo, no que respeita ao primeiro monoconjugado os resultados obtidos são opostos, com o aumento da quantidade detectada deste aducto. Adicionalmente, é possível identificar o pico correspondente à ADR o que pode sugerir que o 2º monoconjugado possa ter sido cindido, com perda de GSH e regeneração da catecolamina. Dada a ambiguidade e as diferenças de resultados entre monoconjugados, este processo não pareceu uma estratégia adequada para o aumento da dessorção dos compostos da alumina.

Simultaneamente, foi também possível constatar que a imersão das amostras num banho de ultra-sons não aumenta a eficácia do processo de extracção, dada a ausência de diferenças relevantes entre os valores de áreas obtidos para amostras extraídas com ou sem imersão em banho de ultra-sons.

Após a extracção das amostras em todas as condições previamente descritas foram adicionados 150 μ L de PCA a 5% à alumina remanescente e injectados 20 μ L do respectivo sobrenadante. Em todos os casos foi possível detectar, ainda, a presença de aductos (resultados não apresentados) o que permitiu concluir que nenhuma destas tentativas seria vantajosa na optimização do processo extractivo.

4.4.2 O aducto 5-(glutation-S-il)- α -metildopamina (5-GSH- α -MeDA) como padrão interno

Vários parâmetros foram avaliados no sentido de adaptar o processo de extracção descrito para as catecolaminas à extracção dos correspondentes aductos com a GSH. Durante a optimização do referido processo de extracção efectuaram-se estudos relativos à possibilidade de utilização de um padrão interno. Esta questão levantou-se uma vez que, na bibliografia consultada relativamente à extracção de catecolaminas em amostras biológicas, a maioria dos trabalhos reportavam a utilização de 3,4-dihidroxibenzilamina como padrão interno, dada a sua semelhança estrutural com as próprias catecolaminas (215, 217, 220-222, 231, 236-241).

Um padrão interno define-se como uma substância que não se encontra presente na amostra, com propriedades físico-químicas tão semelhantes quanto possível às da substância a identificar e que é adicionada a cada amostra bem como a cada padrão de calibração (242). Neste sentido, efectuou-se o estudo do comportamento do monoconjugado da α -metildopamina com a GSH (5-GSH- α -MeDA; PM: 553,42 g/mol) no que respeita ao processo de adsorção na alumina ([Figura 4.41](#)) com o objectivo de averiguar a sua possível utilização como padrão interno. Dada a sua semelhança estrutural, seria de esperar que

estes compostos se comportariam da mesma forma durante o processo de extracção. Desta forma, utilizando um padrão interno com características semelhantes aos compostos a determinar, as áreas dos picos dos aductos seriam corrigidas em função da recuperação do padrão interno, cuja concentração na amostra seria conhecida, permitindo, também, efectuar um controlo mais rigoroso das variações de sensibilidade do detector electroquímico.

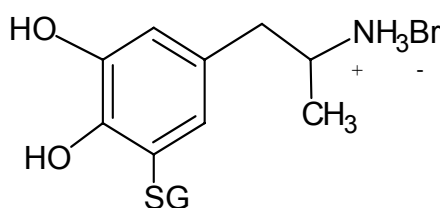


Figura 4.41 - Estrutura do aducto 5-(glutathion-S-yl)-α-MeDA (5-GSH-α-MeDA ; PM=553,42 g/mol)

Contudo, ainda antes de efectuar o estudo do comportamento deste composto durante o processo de extracção, tornou-se necessário avaliar a resposta do detector face à presença deste composto. Deste modo, tornou-se útil verificar se o detector apresentava uma resposta linear em função da concentração deste possível padrão interno. Para o efeito, prepararam-se as seguintes soluções de diferentes concentrações de 5-GSH-α-MeDA: 0,16; 0,2; 0,4; 0,8; 2; 4; 5; 10 e 100 µM. Todas as soluções foram preparadas em PCA a 5% e armazenadas a -80 °C (com excepção da alíquota que permaneceu à temperatura ambiente no *vial* para injeção em HPLC, correspondente a uma concentração de 2 µM). Procedeu-se à injeção no sistema de HPLC-ED de 20 µL de cada solução nas mesmas condições cromatográficas obtendo-se, por detecção electroquímica, os correspondentes cromatogramas. Após a integração da área do pico obtido em cada cromatograma, procedeu-se à representação gráfica da área em função da concentração do composto ([Figura 4.42](#)[Figura 4.42](#)).

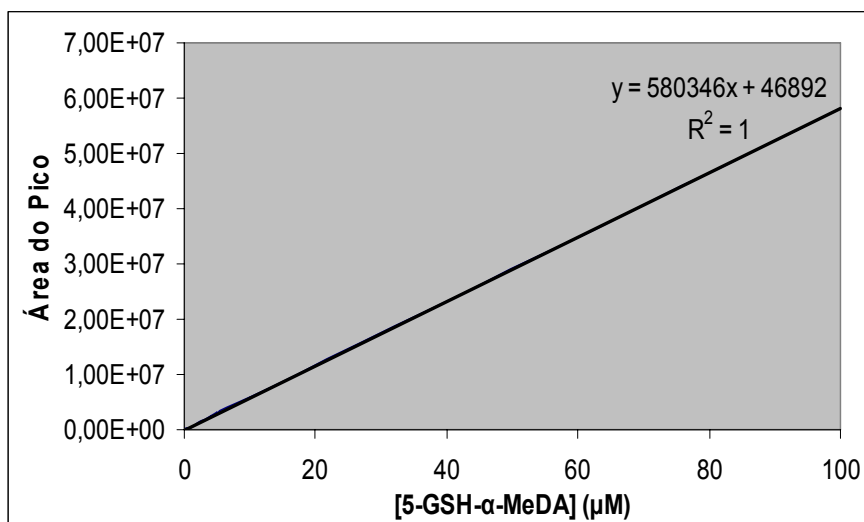


Figura 4.42 - Curva de calibração do monoconjugado da metildopamina com a GSH (5-GSH-α-MeDA 0,16 a 100 μM em PCA a 5%).

Pela análise da [Figura 4.42](#) foi possível constatar que o detector responde à presença deste composto de uma forma linear, directamente proporcional à concentração do aducto.

No que respeita à solução de concentração 2 μM deste monoconjugado, procedeu-se ao estudo da sua estabilidade à temperatura ambiente. Para o efeito, após a preparação e injeção (20 μL) imediata da referida solução, esta foi mantida no *vial* de injeção à temperatura ambiente para posterior re-injeção (20 μL) 24 horas depois. Uma outra alíquota foi, de imediato, congelada a -80 °C para análise da sua estabilidade a esta temperatura de conservação. As amostras mantidas a estas duas temperaturas foram injectadas (20 μL) 24 horas após a sua preparação e os correspondentes cromatogramas obtidos por detecção electroquímica. As áreas dos picos detectados nos cromatogramas correspondentes a estas três injeções (injecção imediata, 24 h TA e 24 h -80 °C) foram integradas, tal como ilustra a [Tabela 4.20](#).

Tabela 4.20 - Valores de área do pico correspondente ao composto 5-GSH- α -MeDA (2 μ M) em função da condição experimental a que foi submetida a amostra.

Condição de Conservação	Área do Pico do conjugado 5-GSH- α -MeDA
Injecção imediata após preparação	1,11E+06
24 h à temperatura ambiente	1,18E+06
24 h a -80°C	1,11E+06
Média	1,13E+06
Desvio Padrão médio	3,30E+04
Coefficiente de Variação (%)	2,92

Pela análise da ~~Tabela 4.20~~ verificou-se que este monoconjugado da metildopamina apresenta uma boa estabilidade em meio ácido (PCA a 5%), quer à temperatura ambiente quer a -80°C, dado o baixo coeficiente de variação obtido após a integração da área do pico para cada uma das situações experimentais testadas.

Posteriormente, procedeu-se à avaliação do comportamento deste composto (5-GSH- α -MeDA) face ao processo de extracção pela alumina. No que respeita à avaliação do seu comportamento face ao processo de extracção pela alumina foram submetidas ao processo de extracção soluções de 5-GSH- α -MeDA (750 μ L) preparadas em PCA a 5% nas seguintes concentrações: 0,06; 0,08; 0,16; 0,8; 2; e 4 μ M. A dessorção do composto da alumina foi efectuada pela adição de 300 μ L de PCA a 5%. As amostras extraídas foram, posteriormente, injectadas (20 μ L) no sistema de HPLC-ED nas mesmas condições cromatográficas obtendo-se, por detecção electroquímica, os respectivos cromatogramas, tal como o ilustrado na ~~Figura 4.43~~ para a solução 5-GSH- α -MeDA 2 μ M. Após a integração da área do pico correspondente a cada uma das amostras extraídas foi possível constatar que, contrariamente ao esperado, o processo de extracção não concentrava a amostra, com a área do pico da amostra não extraída a ser bastante superior ao da amostra extraída (~~Figura 4.43~~).

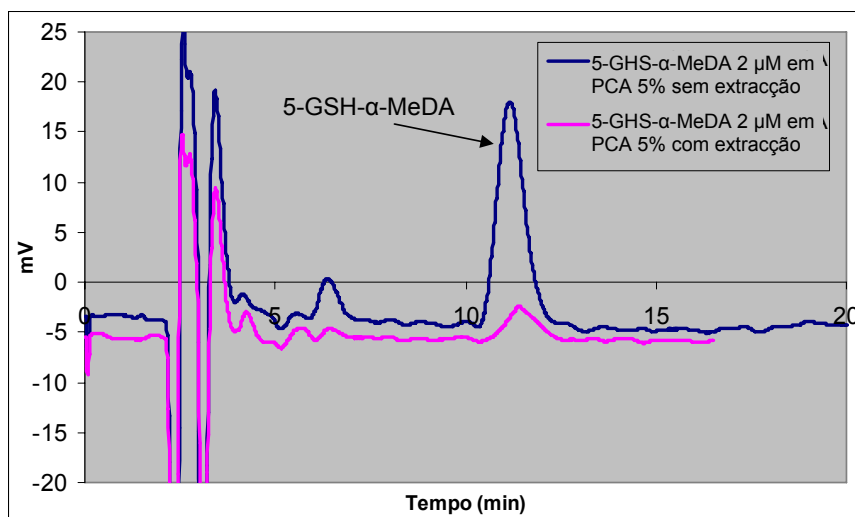


Figura 4.43 - Cromatogramas obtidos após injeção de amostras extraídas e não extraídas de 5-GSH- α -MeDA 2 μ M.

Deste modo, apesar da semelhança estrutural entre os monoconjugados das catecolaminas e este monoconjugado da α -metildopamina, este composto não se comportou de igual modo durante o processo de extracção, com as áreas dos picos de amostras extraídas a serem substancialmente inferiores às áreas dos picos das amostras não submetidas ao processo de extracção. Este facto sugere que, ao contrário da extracção dos aductos das catecolaminas biogénicas, a extracção deste composto pela alumina não apresenta vantagens e, consequentemente, dada a falta de correspondência entre comportamentos face à extracção, teve de ser rejeitada a hipótese da sua utilização como padrão interno.

Contudo, este estudo prosseguiu no sentido de averiguar se as áreas inferiores dos picos das amostras extraídas se deviam a perdas durante o processo de extracção ou à incapacidade do PCA em remover este composto da alumina. Para o efeito, pelo filtro que continha a alumina usada na extracção da amostra com 4 μ M de 5-GSH- α -MeDA, fez-se passar 200 μ L de PCA a 5% com o objectivo de averiguar a eventual presença de composto ainda adsorvido na alumina. Foi de facto o que se observou uma vez que, após a injeção de 20 μ L da solução que passou pela alumina (2ª adição) foi, ainda, possível detectar o

composto. Procedeu-se, de seguida, à 3ª e 4ª adição de 200 µL de PCA a 5% e, mesmo nestas situações, foi possível detectar quantidades de compostos muito semelhantes às da primeira extracção, semelhança essa avaliada pela análise das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas ilustrados na [Figura 4.44](#).

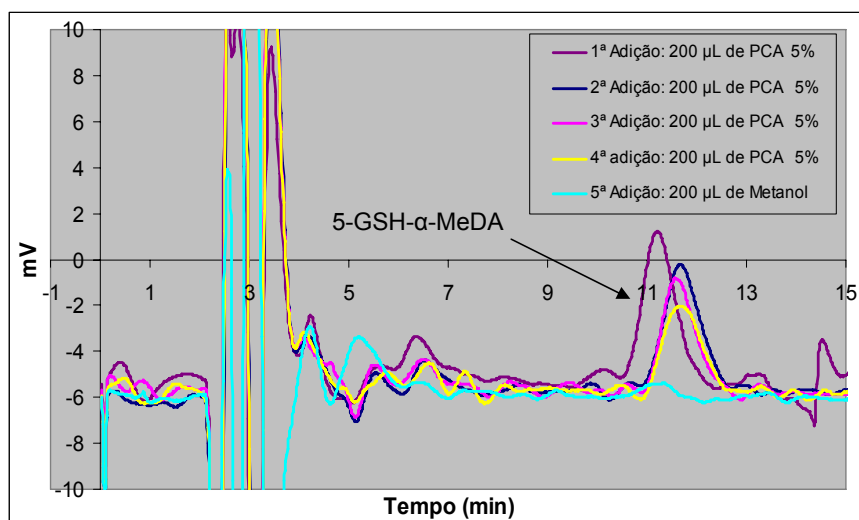


Figura 4.44 - Cromatogramas obtidos pela injeção de 20 µL de solvente extractor usado na 1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª adições à alumina usada durante o processo de extracção de uma amostra de 4 µM de 5-GSH-α-MeDA.

Pela análise da [Figura 4.44](#), depreendeu-se que o PCA a 5% não é muito eficaz na remoção do aducto 5-GSH-α-MeDA da alumina, sendo essa eficácia significativamente diferente da observada relativamente aos aductos das catecolaminas. Por conseguinte, com este estudo demonstrou-se, novamente, a incapacidade de utilizar este composto como padrão interno, uma vez que o PCA não apresenta a capacidade de extrair o 5-GSH-α-MeDA da alumina na mesma extensão que consegue extrair os aductos das catecolaminas biogénicas com a GSH. Foi, igualmente, efectuada uma 5ª adição de solvente extractor à alumina usada na extracção de uma amostra de 5-GSH-α-MeDA 4 µM utilizando metanol 100% para retirar o composto da alumina. Contudo, tal como se pode ver pela [Figura 4.44](#), este solvente não consegue remover o aducto da alumina.

No entanto, isto poderia dever-se ao facto de corresponder à quinta adição de solvente à alumina utilizada na adsorção do composto e a quantidade do mesmo ser já diminuta.

Por último, com o objectivo de avaliar a capacidade de utilização de outros solventes na extracção deste composto, foi efectuada a 2ª adição de solvente extractor à alumina usada na extracção da amostra de 5-GSH- α -MeDA 2 μ M, utilizando um solvente que não o PCA a 5% ([Figura 4.45](#)~~Figura 4.45~~). Para o efeito, efectuou-se a 2ª adição de 200 μ L de metanol 30% ao filtro contendo a alumina usada na extracção da solução 5-GSH- α -MeDA 2 μ M, seguindo-se a sua injeção (20 μ L) no HPLC. Os cromatogramas foram, igualmente, obtidos por detecção electroquímica ([Figura 4.45](#)~~Figura 4.45~~).

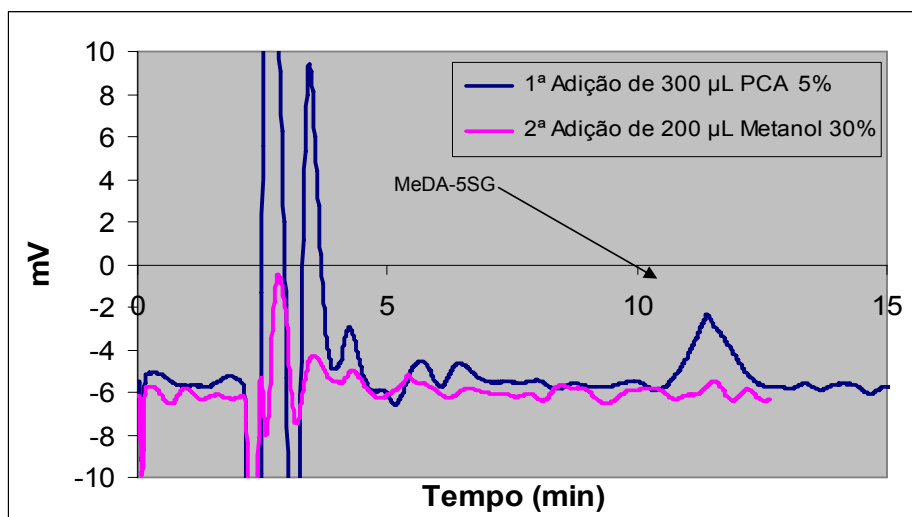


Figura 4.45 - Cromatogramas obtidos pela injeção de 20 μ L de PCA a 5% usado na 1ª adição e 20 μ L de Metanol 30% usado na 2ª adição pela alumina usada durante o processo de extracção de uma amostra de 2 μ M de 5-GSH- α -MeDA .

Pela análise da [Figura 4.44](#)~~Figura 4.44~~ e da [Figura 4.45](#)~~Figura 4.45~~ foi possível verificar que o metanol (quer 100% quer 30%) não apresenta a capacidade de remover o composto adsorvido na alumina.

Pelo que foi acima referido, abandonou-se a hipótese de utilização deste composto como padrão interno para efectuar o controlo do processo de extracção.

Contudo, no futuro, poderá utilizar-se este composto não como forma de controlo da eficácia do processo extractivo mas como meio de controlo de possíveis alterações de sensibilidade do detector coulométrico. Para o efeito, após extracção das amostras pelo método de adsorção na alumina este composto poderá ser adicionado ao extracto, permitindo controlar o desempenho do detector.

4.4.3 Avaliação da formação de aductos na ausência de tirosinase

A oxidação das catecolaminas pode, como já referido, ocorrer por um fenómeno de autooxidação. Esta reacção é favorecida em meio alcalino, mas a pH fisiológico é extremamente lenta (59). No entanto, em meio fisiológico, a oxidação das catecolaminas pode ser catalisada por enzimas, metais de transição e por radicais (50). Este processo de oxidação foi já abordado em pormenor no capítulo introdutório e, com base nesse conhecimento, levantou-se a questão da possível formação de aductos (como consequência da oxidação das catecolaminas) durante a etapa do processo de extracção em que ocorre a agitação da amostra com a alumina a pH 8,2-8,6 por um período de 15 minutos.

No âmbito de todo o trabalho experimental realizado, no sentido da implementação de uma metodologia para detecção destes compostos, este aspecto não se revelou importante, uma vez que toda a catecolamina usada na mistura reaccional sofre oxidação e conjugação na etapa inicial (antes da extracção), dada a presença de tirosinase e de excesso de GSH (deste modo não existirá catecolamina disponível para sofrer oxidação durante o referido período de agitação). Contudo, dado que o objectivo de todo o trabalho é a implementação desta metodologia para determinação de aductos em amostras biológicas, deve avaliar-se a possível formação destes compostos devido ao excesso de catecolamina endógena não oxidada, uma vez que no momento da referida agitação, o pH alcalino pode favorecer a autooxidação das catecolaminas e a consequente conjugação com a GSH existente, por exemplo, no soro. A

quantidade de aductos detectada poderia ser alvo de erros, uma vez que a etapa de agitação estaria a contribuir para a sua formação espontânea.

Deste modo, em estudos iniciais, foram efectuadas duas misturas de soluções de ADR e GSH em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, as quais foram injectadas (20 µL) no sistema de HPLC-ED no sentido de detectar a presença destes compostos (concentração final de ADR e GSH de 0,5 mM). Essas misturas não foram, inicialmente, sujeitas ao processo de extracção, uma vez que se pretendeu avaliar a possível formação destes compostos a pH fisiológico. A diferença entre as duas misturas efectuadas consiste no tempo de contacto entre a ADR e a GSH, o qual foi de 20 e 60 minutos.

Com o objectivo de saber os tempos de retenção dos aductos, e assim permitir a sua detecção, foi injectada (20 µL), nas mesmas condições, uma mistura reaccional controlo (TP + ADR 10 µM + GSH 0,5 mM + TIR) em que, dada a existência de tirosinase, a totalidade da catecolamina foi oxidada e conjugada. Foi igualmente injectada a solução de catecolamina sem GSH no sentido de verificar a possível existência de picos interferentes. Os cromatogramas obtidos encontram-se ilustrados na [Figura 4.46](#).

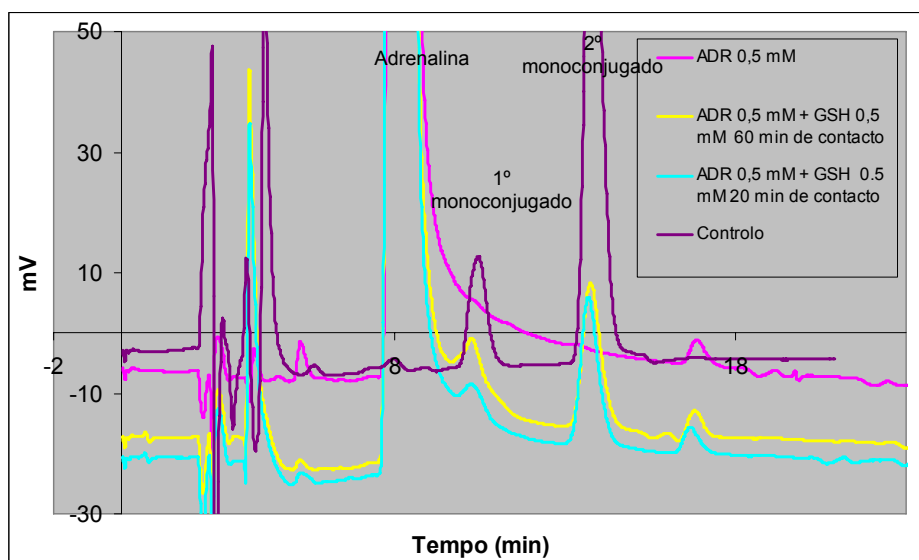


Figura 4.46 – Cromatogramas obtido, por detecção electroquímica, durante o estudo de avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, após preparação de uma mistura de adrenalina e GSH em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,4 (ADR 0,5 mM + GSH 0,5 mM).

Pela análise da [Figura 4.46](#) verificou-se que o período de contacto da ADR com a GSH a pH fisiológico (7,4) foi suficiente para ocorrer a oxidação da catecolamina e consequente conjugação com a GSH. Dada a ausência, no cromatograma correspondente à injeção da solução de ADR (rosa), de qualquer pico com tempo de retenção igual ao dos aductos (tempo esse comprovado pela injeção do controlo, roxo) pode-se concluir que os compostos detectados não são interferências mas sim, compostos que se formam como consequência do contacto da ADR com a GSH a pH fisiológico. No cromatograma correspondente à injeção da solução de ADR surge, além do pico correspondente à catecolamina (8 min), apenas um pico com tempo de retenção aproximado de 17 minutos e que, deste modo, não interfere com a detecção dos aductos. Por conseguinte, apesar de a pH fisiológico o processo de autooxidação ser, tal como referido anteriormente, extremamente lento, acredita-se que esta reacção de oxidação esteja a ocorrer quimicamente, favorecida, neste caso, pela elevada concentração de ADR.

Este estudo foi repetido, desta vez testando uma menor concentração de ADR na mistura com a GSH (ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM). Após preparação da referida mistura em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, esta foi colocada no vial de injeção à temperatura ambiente e procedeu-se à sua injeção no sistema de HPLC ao longo do tempo. Deste modo, a mistura foi injectada (20 μ L) a diferentes tempos, nomeadamente após 60, 130 e 310 minutos de contacto entre os dois compostos, com o objectivo de avaliar os compostos que se poderiam formar como consequência do contacto da ADR e com a GSH no *vial* de injeção ao longo do tempo. Da injeção desta mistura e da correspondente solução contendo só ADR obtiveram-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.47](#).

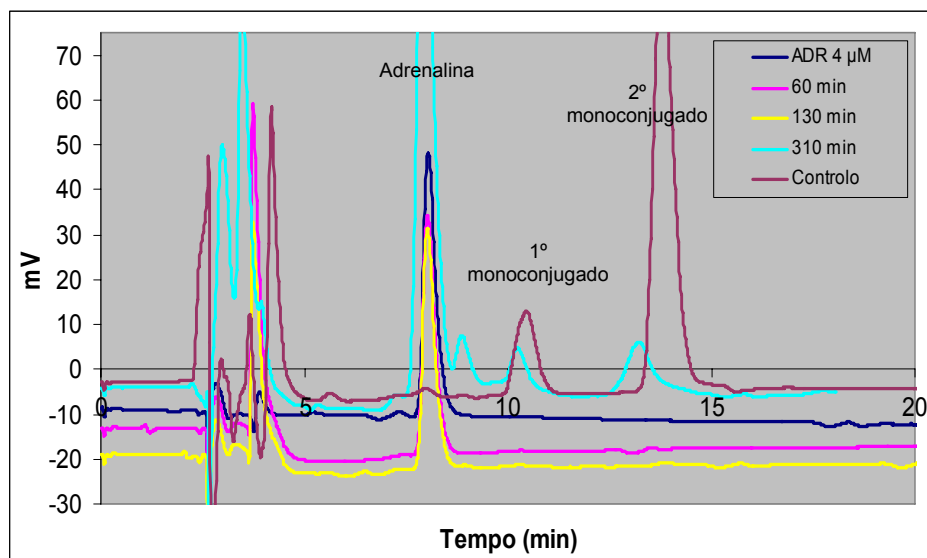


Figura 4.47 - Cromatogramas obtido, por detecção electroquímica, durante o estudo de avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, após preparação de uma mistura de adrenalina e GSH em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,4 (ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM).

Pela análise da figura acima representada verificou-se que, com uma menor concentração de ADR, após o contacto de uma hora com a GSH, não é possível detectar a presença de aductos na mistura (rosa). A mistura foi re-injectada após um período de 130 minutos de reacção (amarelo), continuando sem se detectarem os aductos com a GSH. Contudo, após 310 minutos de contacto entre os dois compostos no *vial* de injeção à temperatura ambiente foi já possível detectar a presença de dois picos de tempo de retenção igual ao dos monoconjugados da GSH com a ADR. Desta forma, os dois compostos continuaram a reagir no *vial* de injeção, dando origem aos aductos correspondentes. Contudo, dada a menor concentração de ADR, foi necessário um maior período de tempo de contacto até ocorrer a sua detecção. Este maior período de tempo não significa que a reacção foi mais lenta mas sim que, dada a menor concentração de catecolamina, foi necessário um maior período de tempo de contacto entre os dois compostos para que os produtos resultantes se formassem numa quantidade suficiente para permitir a sua detecção. De salientar

que nesta ultima injeção (cromatograma turquesa) ocorreu uma ligeira antecipação do tempo de retenção do segundo pico.

Deste modo comprova-se, mais uma vez, a necessidade de acidificação imediata das amostras biológicas (como, por exemplo, soro humano), aquando da sua chegada ao laboratório, para detecção e quantificação de aductos. Esta acidificação imediata visa impedir a possível degradação dos compostos a pH fisiológico (comprovada no estudo da estabilidade dos compostos a este pH) e, por outro lado, evitar que, perante elevadas concentrações de catecolaminas e GSH, possa ocorrer a formação destes compostos após a recolha das amostras, levando a erros na quantificação dos compostos em análise.

Por outro lado, e antes de avaliar a possível formação de aductos durante a agitação com a alumina a pH alcalino, foi necessário proceder à preparação das soluções em meio ácido (PCA a 5%) para garantir que essa formação não se inicia imediatamente após o contacto das duas soluções, tal como acontece quando estas são preparadas em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,4. Desta forma, prepararam-se, em PCA a 5%, diversas misturas de ADR e GSH na ausência de tirosinase cujas concentrações finais eram de 1 e 2 mM, respectivamente.

Uma dessas misturas não foi sujeita ao processo de extracção com o objectivo de avaliar a formação de aductos em meio ácido ao longo do tempo. Para o efeito, após a sua preparação, a amostra foi injectada de imediato (20 µL) no sistema de HPLC-ED e, posteriormente, re-injectada 3 horas depois (2ª injeção) e 24 horas após permanecer à temperatura ambiente, obtendo-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.48](#)~~Figura 4.48~~. Foi, igualmente, injectada uma solução que continha apenas ADR com o objectivo de avaliar a ausência de interferências, assim como uma mistura reaccional catalisada pela tirosinase com o objectivo de averiguar os tempos de retenção dos aductos (amostra designada por controlo e que consiste em ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).

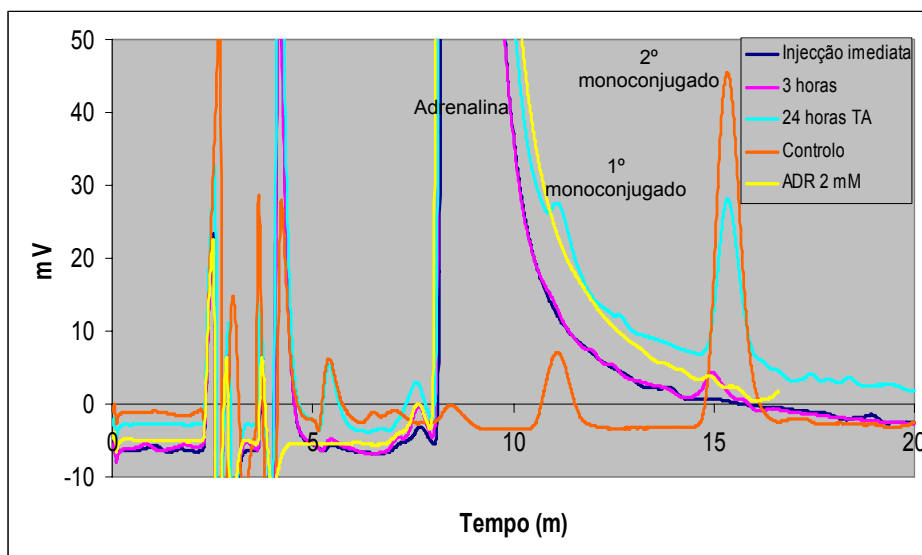


Figura 4.48 - Avaliação da formação de adutos, na ausência de tirosinase, após preparação de uma mistura de adrenalina e GSH em PCA a 5% (ADR 1 mM + GSH 2 mM).

Pela análise da [Figura 4.48](#) verificou-se que no dia da preparação da mistura em meio ácido não é possível detectar uma formação relevante de adutos, notando-se apenas o aparecimento de um pequeno pico correspondente ao 2º aduto, decorridas 3 horas após a preparação da mistura (2ª injeção). Após 24 horas de contacto dos dois compostos à temperatura ambiente foi já possível detectar os monoconjugados correspondentes, sendo essa formação mais acentuada relativamente ao segundo monoconjugado da ADR com a GSH.

Desta forma, pretendeu-se avaliar, de seguida, a provável formação destes compostos ao longo do tempo quando mantidas as soluções à temperatura ambiente e a -80 °C. Para o efeito, após a preparação de uma das misturas acima referidas (ADR 1 mM e GSH 2 mM em PCA a 5%) procedeu-se à sua injeção imediata (20 µL) e manteve-se uma alíquota à temperatura ambiente e outra conservada a -80 °C durante 48 horas. Após a injeção, nas mesmas condições cromatográficas, das referidas alíquotas obtiveram-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.49](#). Foi, igualmente, injectada uma mistura reaccional catalisada pela tirosinase com o objectivo de averiguar os tempos de

retenção dos aductos para, deste modo, permitir a sua detecção nas restantes amostras (amostra designada por controlo e que consiste em ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR).

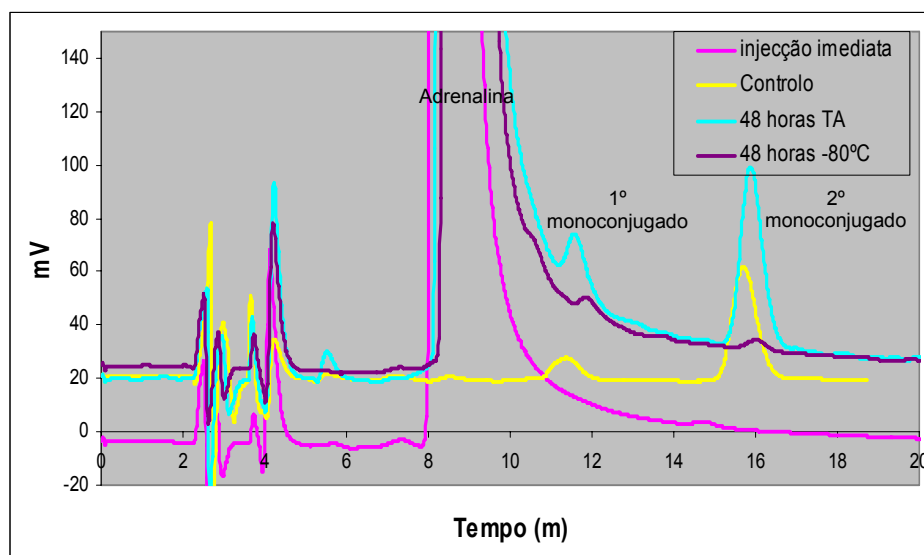


Figura 4.49 - Avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, após preparação de uma mistura de adrenalina e GSH em PCA a 5% (ADR 1 mM + GSH 2 mM).

Pela análise da [Figura 4.49](#) confirmou-se que a manutenção das amostras à temperatura ambiente pode contribuir para a produção de aductos, mesmo em meio ácido e na ausência da enzima catalisadora da reacção. Desta forma se estipula que as amostras biológicas devem ser armazenadas a -80°C , após acidificação, uma vez que a presença de catecolaminas pode contribuir para a formação dos respectivos aductos durante o armazenamento. A conservação das amostras a esta temperatura minimiza a formação dos referidos compostos, facto comprovado pelos picos extremamente reduzidos detectados na [Figura 4.49](#) (cromatograma roxo). No entanto, o período de conservação das amostras deverá ser tão breve quanto possível, recomendando-se a sua rápida extracção e análise por HPLC-ED.

Posteriormente, decidiu-se avaliar a possível formação dos aductos (na ausência de tirosinase) durante a etapa de agitação com a alumina e o tampão

Tris/EDTA no processo de extracção (de salientar que as amostras foram extraídas imediatamente após a sua preparação). Adicionalmente, e de forma a evitar a sua formação, efectuou-se um estudo no sentido de avaliar o papel antioxidante do ácido ascórbico na prevenção da reacção da catecolamina com a GSH. Deste modo, utilizaram-se misturas de ADR e GSH (ADR 1 mM + GSH 2 mM em PCA a 5%) que foram submetidas ao processo de extracção pela alumina. A diferença entre as amostras extraídas reside na presença ou ausência de ácido ascórbico 1 mM (AA) no tampão de extracção Tris/EDTA (em duplicado). Após a extracção procedeu-se à dessorção dos compostos presentes nas amostras pela adição de 2*150 µL de PCA a 5% e à posterior injeção no sistema de HPLC-ED de 20 µL das amostras referidas, assim como de uma amostra controlo (TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) com o objectivo de averiguar os tempos de retenção dos aductos. Após a injeção das amostras nas mesmas condições cromatográficas obtiveram-se, por detecção electroquímica, os cromatogramas ilustrados na Figura 4.50 ~~Figura 4.50~~.

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

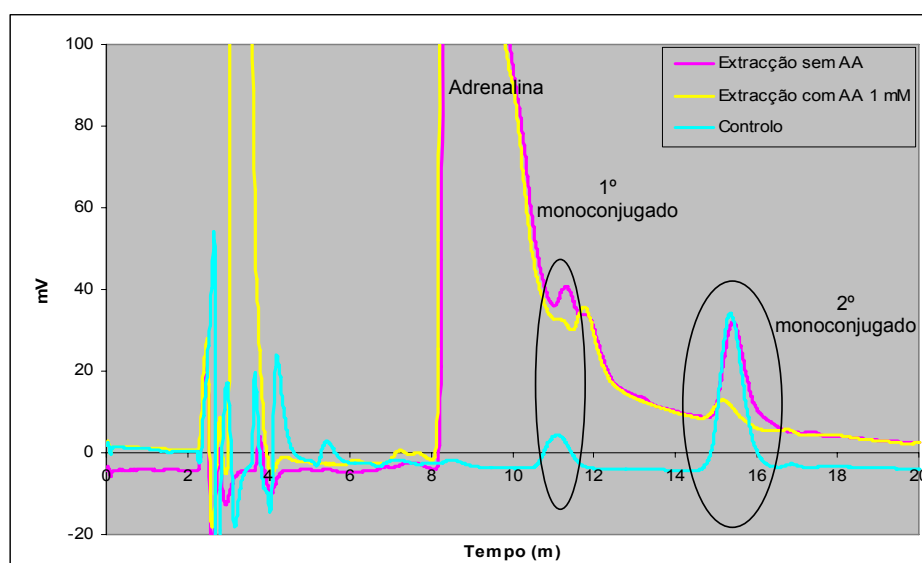


Figura 4.50 - Avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, durante a etapa de agitação da amostra (ADR 1 mM + GSH 2 mM) com a alumina e o tampão Tris/EDTA na presença e na ausência de ácido ascórbico 1 mM.

Pela análise da [Figura 4.50](#) verificou-se que ocorre a formação de aductos durante a etapa de agitação das amostras com a alumina. Contudo, essa formação é fortemente inibida pela presença de ácido ascórbico no tampão Tris/EDTA. Deste modo, efectuou-se um novo estudo utilizando uma concentração superior de ácido ascórbico (5 mM) no tampão Tris/EDTA no sentido de averiguar se haveria uma inibição total da reacção da catecolamina com a GSH. Para o efeito, utilizaram-se diversas misturas de ADR e GSH (ADR 1 mM + GSH 2 mM) em que uma não foi submetida ao processo de extracção e as restantes extraídas pelo método de extracção pela alumina. A diferença entre as amostras extraídas residiu na presença ou ausência de ácido ascórbico 5 mM (AA) no tampão de extracção Tris/EDTA (em duplicado). Após a extracção procedeu-se à dessorção dos compostos presentes nas amostras pela adição de 300 µL de PCA a 5% e à injeção, no sistema de HPLC-ED, de 20 µL das amostras, assim como de uma amostra controlo (mistura reaccional catalisada pela tirosinase: TP + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR) obtendo-se, por detecção electroquímica, os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.51](#).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

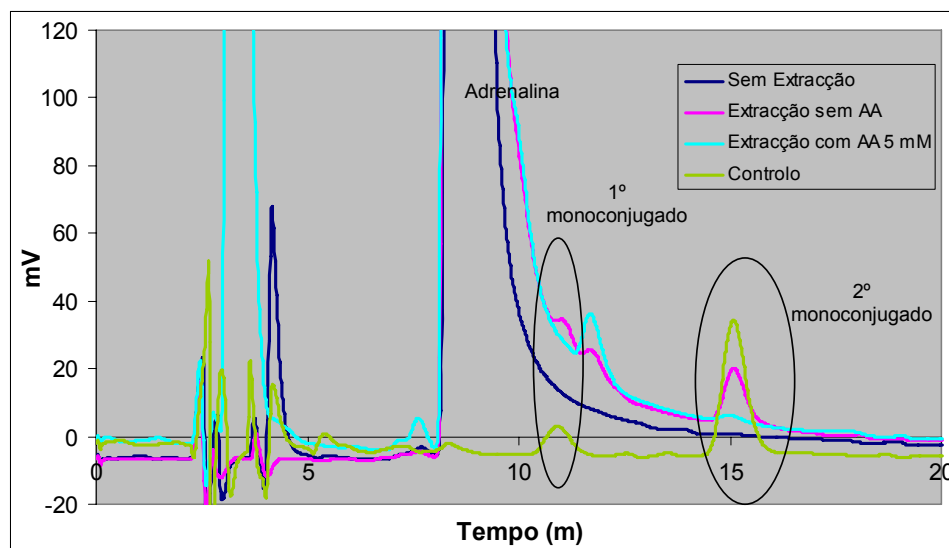
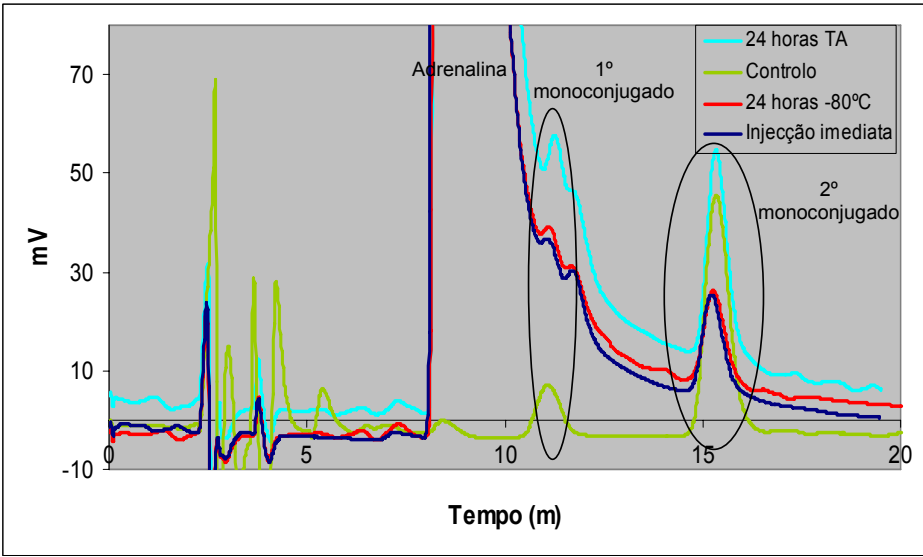


Figura 4.51 – Avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, durante a etapa de agitação da amostra (ADR 1 mM + GSH 2 mM) com a alumina e o tampão Tris/EDTA na presença e na ausência de ácido ascórbico 5 mM

Pela análise da [Figura 4.51](#)~~Figura 4.51~~ verificou-se, mais uma vez, o importante papel do ácido ascórbico na prevenção da formação de aductos durante a etapa de agitação das amostras com a alumina. Esta formação poderia originar erros na quantificação das amostras, dado que estes compostos estariam a ser formados durante o processo de extracção. Além disso, verificou-se que, com esta concentração de antioxidante, ocorre a inibição total da formação do primeiro monoconjugado e a prevenção quase total da formação do segundo. Por conseguinte, conclui-se que, na análise futura de amostras biológicas, se torna necessária a presença deste ácido no tampão Tris/EDTA numa concentração final de 5 mM. De salientar as elevadas concentrações de ADR utilizadas no presente estudo, comparativamente aos baixos níveis plasmáticos de adrenalina encontrados em condições fisiológicas (que não ultrapassam a ordem de grandeza da décima parte do nanomolar) (230) e aos níveis plasmáticos já reportados para situações patológicas, como o feocromocitoma (na ordem dos nanomolar) (74). Deste modo, mesmo perante a elevada concentração de ADR utilizada no presente estudo, tornou-se notório e relevante o importante papel do ácido ascórbico na prevenção da formação de aductos, sendo de prever a completa inibição da formação de aductos perante as concentrações desta catecolamina esperadas a nível biológico.

Após a injeção das amostras extraídas, uma alíquota de cada amostra foi mantida à temperatura ambiente e outra conservada a -80 °C para injeção 24 horas depois. Este estudo teve como objectivo avaliar, uma vez mais, a estabilidade das soluções. Após injeção no sistema de HPLC-ED de 20 µL de cada amostra foi possível obter os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.52](#)~~Figura 4.52~~.

A



B

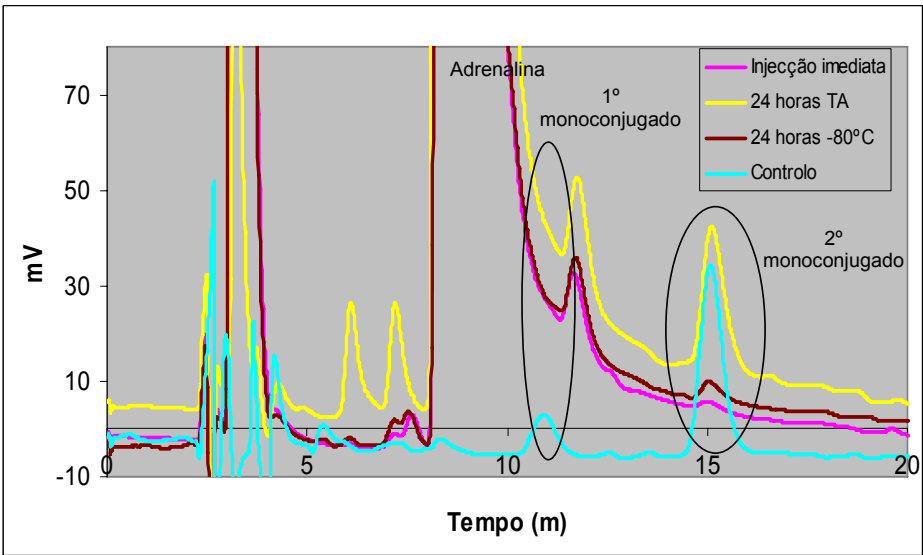


Figura 4.52 - Avaliação da formação de aductos, na ausência de tirosinase, durante a etapa de agitação da amostra (ADR 1 mM + GSH 2 mM) com a alumina e o tampão Tris/EDTA na ausência (A) e na presença (B) de ácido ascórbico 5 mM, ao longo do tempo e em função da temperatura de conservação.

Pela análise da [Figura 4.52](#) verificou-se que a manutenção das soluções à temperatura ambiente contribui para a formação continuada de aductos dada a elevada quantidade de catecolamina presente na amostra. Este facto verificou-se mesmo nas amostras extraídas na presença de ácido ascórbico. Contudo, a conservação das amostras a -80 °C permitiu constatar a estabilidade das soluções a esta temperatura, uma vez que os cromatogramas obtidos foram idênticos aos decorrentes da injeção imediata das amostras após a preparação das misturas (ADR 1 mM + GSH 2 mM em PCA a 5%).

Pelo que foi acima referido impõe-se a extracção imediata das amostras biológicas após a sua obtenção, devendo esta extracção ser efectuada na presença de ácido ascórbico 5 mM no tampão de extracção. Adicionalmente, recomenda-se a conservação das amostras a -80 °C até à sua posterior análise por HPLC-ED, a qual deverá ser efectuada tão breve quanto possível. Durante os estudos de optimização do processo de extracção dos aductos das catecolaminas com a GSH não se utilizou este antioxidante, uma vez que foram usadas misturas reaccionais em que a totalidade da catecolamina foi, como já referido, previamente oxidada e conjugada numa reacção catalisada pela tirosinase. Deste modo, no momento da extracção, não existe catecolamina disponível para sofrer oxidação e conjugação durante a etapa de agitação com o tampão Tris/EDTA.

Ainda no sentido de avaliar a possível formação de aductos durante o período de agitação das soluções com a alumina foi efectuada um estudo complementar com a introdução de duas variáveis ao estudo:

- a realização da agitação com a alumina ao abrigo da luz, no sentido de eliminar o contributo da luminosidade no favorecimento do processo de autooxidação;
- a degasificação do tampão Tris/EDTA, no sentido da eliminação de possíveis gases (como, por exemplo, o O₂) que poderão favorecer o processo oxidativo.

Foram efectuadas misturas de ADR e GSH, em PCA a 5%, nas seguintes concentrações: ADR 1 mM + GSH 30 μ M e ADR 4 μ M + GSH 2 mM. Após a preparação das misturas procedeu-se, de imediato, ao processo de extracção pela alumina em que uma alíquota de cada mistura foi agitada ao abrigo da luz e com um tampão Tris/EDTA desgasificado e outra agitada com a alumina em condições normais, ou seja, na presença de luz e sem desgasificação do tampão de extracção. Os compostos foram removidos da alumina pela adição de 300 μ L de PCA a 5%, seguindo-se a injeção (20 μ L) das amostras nas mesmas condições cromatográficas. Após injeção das amostras acima referidas foi possível obter, por detecção electroquímica, os respectivos cromatogramas (resultados não apresentados). Os resultados obtidos demonstraram que não ocorre uma prevenção relevante da formação espontânea de aductos, comparativamente com os resultados obtidos relativamente à utilização de ácido ascórbico no tampão de extracção. De facto, a desgasificação do tampão e a agitação ao abrigo da luz reduziu ligeiramente a quantidade de aductos que se formam durante esta etapa mas, contrariamente ao verificado com ácido ascórbico 5 mM, não impediu completamente a sua formação espontânea.

Pelo que foi acima referido depreende-se que os estudos efectuados permitiram o desenvolvimento de um método para a extracção dos referidos aductos de amostras de soro humano, mediante adsorção na alumina. O método de extracção foi optimizado, tendo como base o método publicado para a extracção das catecolaminas de amostras biológicas (215-222, 243). Da optimização do referido processo de extracção são de realçar as seguintes conclusões:

1. Após testar as concentrações de 5, 15, 30, 60 e 100 mM, a concentração de 15 mM de EDTA no tampão de extracção Tris/EDTA foi a que se mostrou ideal para a adsorção dos aductos à alumina;
2. Após testar os períodos de tempo de 30 s e 5, 10, 15, 25 e 35 min de agitação das amostras com a alumina, o período de 15 min foi o mais adequado para a adsorção dos aductos à alumina;
3. Após testar diferentes solventes extractores (PCA a 5, 10 e 15%; ácido acético a 50, 70 e 100%; metanol 100%; fase móvel sem metanol; PCA a

5% saturado com alumínio; PCA a 5% saturado com ditionito de sódio, entre outros) e diferentes condições de extracção (como por exemplo, diferentes temperaturas: temperatura ambiente, 10 minutos a 30 °C, 10 minutos a 40 °C e 10 minutos a 60 °C, e fraccionamento do volume de PCA a 5% em mais do que uma adição -300 µL, 2*150 µL e 3*100 µL), o melhor processo para a extracção dos compostos adsorvidos na alumina foi a adição de 2 vezes 150 µL de PCA a 5%, num processo executado à temperatura ambiente;

4. A extracção pela alumina concentra os aductos.

4.5. FASE V- Validação da metodologia implementada para a detecção dos aductos da adrenalina com a GSH em soro humano

Pretendeu-se utilizar a técnica cromatográfica de HPLC-ED em fase reversa para detecção de aductos da ADR com a GSH em amostras biológicas. A técnica tem como principal objectivo a sua utilização como ferramenta para o estudo da toxicidade associada a estes compostos. Torna-se, deste modo, imperativo proceder à validação da referida técnica.

A validação de uma metodologia define-se como a confirmação, mediante exame analítico, e o fornecimento de provas cabais, de que são respeitados os requisitos específicos para uma determinada utilização pretendida para essa metodologia (242). Constitui-se, deste modo, como uma das medidas universalmente reconhecidas como parte necessária de um sistema compreensivo de garantia de qualidade em química analítica.

A validação de um método faz uso de um conjunto de testes que avaliam qualquer suposição na qual o método analítico é baseado e estabelece e documenta as características de desempenho de um método analítico. No seu conjunto demonstra que o método é ajustado para um propósito analítico particular.

Diversos parâmetros (que se constituem como características típicas de desempenho de métodos analíticos) devem ser avaliados durante todo o processo de validação de um procedimento (244), nomeadamente:

- Aplicabilidade
- Selectividade
- Linearidade e Calibração
- Precisão
- Exactidão
- Limite de Detecção
- Recuperação do Processo
- Limite de quantificação
- Robustez

Dos parâmetros acima mencionados, os relacionados com a determinação da exactidão, robustez e limite de quantificação não foram avaliados, estando esta avaliação dependente da disponibilidade de padrões da substância a analisar (isto é, substância a analisar de teor e pureza conhecidos e certificados, destinada a ser usada como referência no processo analítico) (242). Tal poderá tornar-se possível quando a massa do contra-íão do aducto 5-(glutation)-S-il-adrenalina (utilizado na caracterização dos aductos) estiver claramente definida, permitindo efectuar o estudo de exactidão e a determinação do limite de quantificação deste aducto.

A validação de uma metodologia analítica deve ser aplicada a um protocolo definido para a determinação de um analito específico e numa gama de concentrações, num tipo particular de material de teste, usado para um determinado propósito. Em geral, a validação deve verificar que o método analisa adequadamente, para o objectivo pretendido, a gama completa de concentrações do analito e materiais de teste para os quais é aplicado (244).

No presente trabalho experimental os parâmetros avaliados no âmbito da validação da metodologia implementada foram a selectividade, a precisão (repetibilidade e precisão intermédia), linearidade e calibração, limite de detecção e recuperações do processo de extracção. Estes parâmetros foram avaliados relativamente aos dois monoconjugados da ADR com a GSH, em misturas

reaccionais preparadas em tampão fosfato e em soro humano, nas seguintes condições cromatográficas:

- Sistema cromatográfico HPLC Waters modelo 2690, equipado com um detector electroquímico (detector coulométrico ESA Coulochem II).
- Utilização do sistema de HPLC em fase reversa com recurso a uma coluna Waters Spherisorb 5 μ m ODS2 4,6x250 mm.
- Fase móvel utilizada em modo isocrático com fluxo de 1 mL/min, sendo constituída por ácido cítrico 50 mM, ácido 1-octanesulfónico 0,46 mM, com 10% metanol e pH ajustado a 3,0. De salientar que para a validação da presente metodologia foi necessário proceder à substituição da coluna por uma nova, pelo que se impôs a realização de um novo estudo de definição da percentagem óptima de metanol na fase móvel, tendo sido estabelecida a percentagem de 10%, como a que permitiu a melhor resolução e separação dos picos presentes no cromatograma num período de tempo adequado.
- Os potenciais electroquímicos do detector coulométrico foram estabelecidos de acordo com o definido em 4.1.2, ou seja, E_1 (*screening*): -75 mV; E_2 (analítico): +450 mV; *Guard Cell*: +500 mV. A detecção electroquímica foi definida para o eléctrodo 2 com uma corrente de 5 μ A.
- Volume de Injecção no sistema de HPLC-ED: 20 μ L de amostra.

4.5.1 Selectividade

A selectividade define-se como o grau com o qual um método analítico pode identificar e/ou quantificar o analito, com precisão, na presença de interferentes. Idealmente, a selectividade deveria ser avaliada para qualquer interferente importante que possa estar presente (é particularmente importante conferir interferentes semelhantes, no que respeita a aspectos químicos, que possam responder ao teste). Define-se, deste modo, como a capacidade de um método distinguir a substância a analisar de outras substâncias, nas condições experimentais estabelecidas (242). Esta característica depende, essencialmente,

da técnica de medição aplicada, podendo todavia variar de acordo com o tipo de compostos ou de matriz. Deve estimar-se em que medida isto é possível e devem usar-se estratégias para ultrapassar qualquer interferência previsível de outras substâncias quando se utilizar a técnica de determinação descrita, nomeadamente substâncias homólogas, análogas e metabolitos do composto em causa. A investigação de interferências susceptíveis de resultar de componentes da matriz é de importância primordial. Em muitos tipos de análise, a selectividade é essencialmente uma avaliação qualitativa baseada, por exemplo, em testes para a presença de interferências.

Pelo que foi acima referido se depreende que, no âmbito da validação da presente metodologia, deve comprovar-se que a técnica é específica para a detecção dos aductos da adrenalina com a GSH. Para isso deve fazer-se a sobreposição dos cromatogramas correspondentes a uma amostra contendo aductos e a amostras em branco, na mesma matriz de trabalho, analisando-se a perfeita separação dos aductos presentes na amostra e a ausência de interferências com compostos que possam existir na amostra em branco.

Para efectuar estudos de selectividade, as análises de amostras em branco da matriz biológica apropriada (plasma, urina, ou outra matriz) devem ser obtidas de pelo menos seis fontes (245). Deste modo, no âmbito do presente estudo, foram analisados seis soros humanos diferentes, encontrando-se representado na [Figura 4.53](#) o estudo efectuado apenas com um único soro humano, dada a semelhança dos resultados obtidos. Este parâmetro de validação foi avaliado pela injeção de uma amostra em branco (sem aductos) e de uma mistura reaccional, com o objectivo de verificar se na amostra biológica em estudo (soro humano) existe algum composto com tempo de retenção idêntico ao dos compostos em estudo e que, por isso, possa interferir na sua identificação e/ou quantificação. Para o efeito, para cada soro humano testado, foram preparadas as seguintes amostras:

- Amostra em Branco – Soro + GSH 0,5 mM + TIR (sem catecolamina)
- Amostra ADR 4 µM – Soro + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR

Todas as amostras foram sujeitas ao processo de extracção pela alumina utilizando 2*150 µL de PCA a 5% como solvente extractor. Posteriormente, 20 µL

de cada amostra foram injectados no HPLC nas mesmas condições cromatográficas e os respectivos cromatogramas obtidos por detecção electroquímica.

No presente estudo efectuou-se a extracção das amostras pela alumina uma vez que se trata de um procedimento a ser empregue, no futuro, em todas as determinações efectuadas recorrendo à presente metodologia. Além disso, poderão existir interferências no soro humano que são eliminadas pelo referido processo de extracção. Após a injeção das amostras correspondentes ao estudo efectuado com um dos soros humanos testados foi possível obter os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.53](#) [Figura 4.53](#).

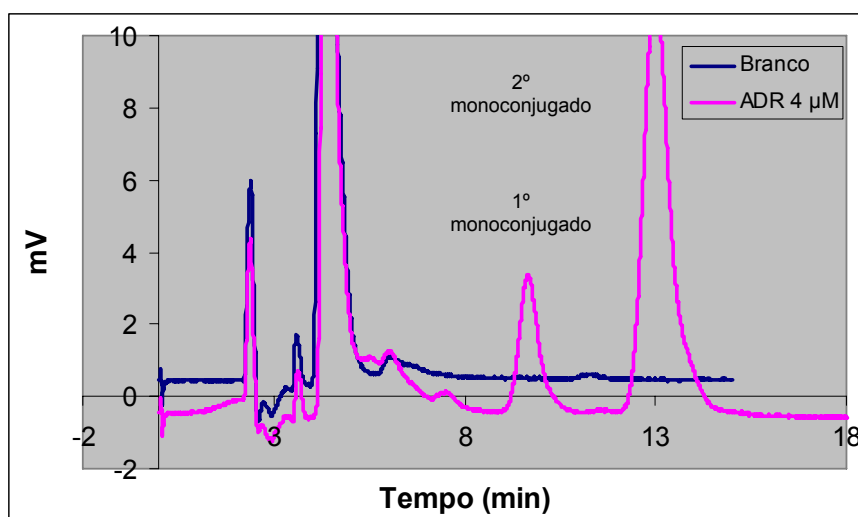


Figura 4.53 – Avaliação da selectividade da metodologia de HPLC-ED para detecção de aductos das catecolaminas com a GSH numa amostra de soro humano (Amostra Branco - Soro + GSH 0,5 mM + TIR e Amostra ADR 4 µM – Soro + ADR 4 µM + GSH 0,5 mM + TIR).

Pela análise dos cromatogramas obtidos verificou-se que a ausência, nas amostras em branco, de picos interferentes com tempos de retenção idênticos aos dos aductos. Deste modo, é possível concluir que esta metodologia de HPLC-ED é selectiva para a detecção de aductos da ADR com a GSH

4.5.2 Precisão

A precisão de um método define-se como o grau de concordância entre os resultados de ensaios independentes obtidos em condições analíticas pré-estabelecidas (mesmo operador, mesmo material e utensílios, mesmo laboratório e curtos intervalos de tempo). A precisão de um procedimento analítico expressa, deste modo, a proximidade dos resultados obtidos em séries de medições obtidas a partir da múltipla amostragem de uma mesma amostra sob condições pré-definidas. O valor da precisão é geralmente expresso em termos de imprecisão e normalmente calcula-se sob a forma de um desvio padrão da média das determinações. Uma menor precisão é indicada através de um elevado desvio padrão (242).

A precisão deve ser avaliada a três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade (246). O estudo da reprodutibilidade não é, normalmente, esperado se for avaliada a precisão intermédia (246).

No âmbito do presente estudo, este parâmetro foi inicialmente avaliado e descrito como precisão em condições de repetibilidade isto é, condições de obtenção de resultados pelo mesmo operador e utilizando o mesmo equipamento (242). Desta forma, avaliou-se a repetibilidade da técnica (ou seja, repetibilidade instrumental ou da injeção) e a repetibilidade do procedimento experimental global (englobando a síntese dos aductos, extracção pela alumina e a injeção no HPLC-ED). A repetibilidade expressa, deste modo, a precisão sob as mesmas condições de trabalho ao longo de um curto intervalo de tempo e, por esse motivo, é muitas vezes designada de precisão intra-ensaio (247).

A avaliação da precisão em condições de reprodutibilidade não foi efectuada, uma vez que correspondem a condições de obtenção de resultados de ensaios com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, mas em laboratórios diferentes, com operadores diferentes e utilizando equipamentos diferentes (242). Deste modo, a reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios (por exemplo através de estudos colaborativos, normalmente aplicados à padronização de uma metodologia) (247).

Contudo, efectuou-se o estudo da precisão intermédia (reprodutibilidade intra-laboratorial), isto é, o estudo da precisão obtida no mesmo laboratório, em condições (pré-estabelecidas) específicas (relativas, por exemplo, ao método, materiais de ensaio, operadores, ambiente) e ao longo de determinados intervalos de tempo. A precisão intermédia expressa variações intra-laboratório, como por exemplo, diferentes dias de análise, diferentes analistas e diferentes equipamentos (248).

A precisão de um método bioanalítico é, deste modo, uma medida do erro aleatório nas determinações analíticas e é definida como a concordância entre medições múltiplas da mesma amostra (249). É, como já referido, expressa como percentagem do coeficiente de variação (% CV) ou como desvio padrão relativo (RSD - *relative standard deviation*).

De acordo com a decisão da Comissão de 12 de Agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados, no caso de análises repetidas de uma amostra em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, o coeficiente de variação (CV) intralaboratorial da média não deve exceder os seguintes valores (242):

Tabela 4.21 - Coeficiente de variação (CV) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de fracções mássicas do elemento.

Fracção mássica	CV (%)
≥ 10 µg/kg a 100 µg/kg	20
> 100 µg/kg a 1 000 µg/kg	15
≥ 1 000 µg/kg	10

Formatted Table

Adicionalmente, de acordo com as normas “Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation” o valor de coeficiente de variação recomendado não deverá exceder os 15%, excepto para determinações efectuadas com valores de concentração perto do limite inferior de quantificação, em que o valor de coeficiente de variação não deverá ser superior a 20% (245).

No presente estudo a precisão foi, então, avaliada em termos de percentagem do coeficiente de variação estabelecendo-se, como valor aceitável para o estudo da precisão da metodologia nos diferentes níveis, um valor inferior a 10%. Deste modo, o valor estipulado como valor de CV aceitável corresponde ao mais baixo valor recomendado nas normas acima citadas, ou seja, um valor inferior a 10%.

4.5.2.1. Repetibilidade instrumental

Um dos parâmetros avaliados na validação desta metodologia de HPLC com detecção electroquímica a utilizar na detecção de aductos da adrenalina com a GSH em amostras biológicas diz respeito à avaliação da repetibilidade do equipamento de HPLC-ED (repetibilidade instrumental).

No referido estudo de avaliação da repetibilidade instrumental procedeu-se à realização de vinte injecções da mesma toma de amostra no HPLC nas mesmas condições cromatográficas e ao longo do mesmo dia de estudo. Os cromatogramas obtidos por detecção electroquímica foram avaliados e as áreas dos picos obtidos integradas, sendo o resultado expresso em coeficiente de variação (%) (desvio padrão/média das áreas dos picos). Este parâmetro foi avaliado para misturas reaccionais efectuadas em tampão fosfato e em soro (TP ou Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR), submetidas e não submetidas ao processo de extracção pela alumina.

O estudo iniciou-se com a avaliação da repetibilidade instrumental perante misturas reaccionais preparadas em tampão fosfato. Para o efeito, efectuou-se a seguinte mistura reaccional em tampão: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR. Uma alíquota desta mistura não foi extraída e foi injectada vinte vezes no HPLC nas mesmas condições cromatográficas, obtendo-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.54](#)~~Figura 4.54~~.

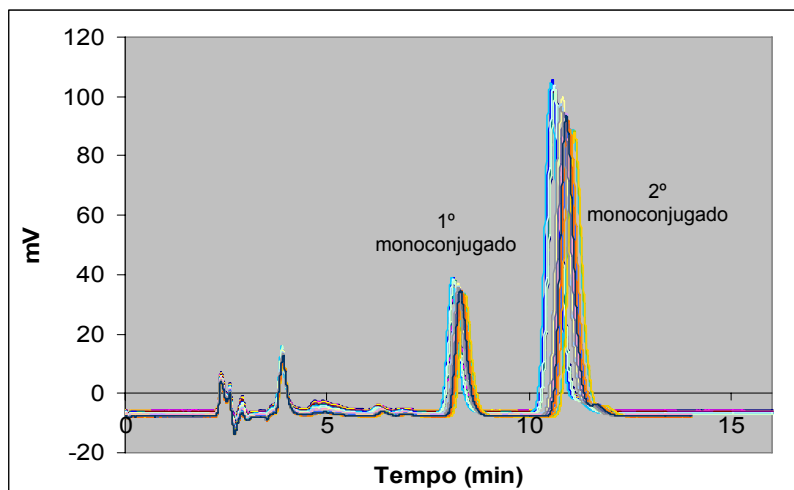


Figura 4.54 – Avaliação da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em tampão (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e não sujeita ao processo de extracção pela alumina.

Para cada cromatograma obtido procedeu-se à integração das áreas dos picos correspondentes aos aductos. Com base no valor médio da área de cada pico e no correspondente desvio padrão foi possível efectuar o cálculo do correspondente coeficiente de variação, medida que reflecte a melhor ou pior repetibilidade instrumental ([Tabela 4.22](#) ~~Tabela 4.22~~).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

Tabela 4.22 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em tampão (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e não sujeita ao processo de extracção pela alumina.

	1º Monoconjugado	2º Monoconjugado
Média	8,44E+05	2,59E+06
Desvio Padrão	1,48E+04	5,42E+04
CV (%)	1,75	2,09

Formatted Table

Uma outra alíquota da mistura efectuada em tampão foi submetida ao processo de extracção recorrendo a 2*150 μ L de PCA a 5% como solvente

extractor. O solvente extractor contendo os aductos foi, posteriormente, injectado vinte vezes no HPLC-ED nas mesmas condições cromatográficas, obtendo-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.55](#).

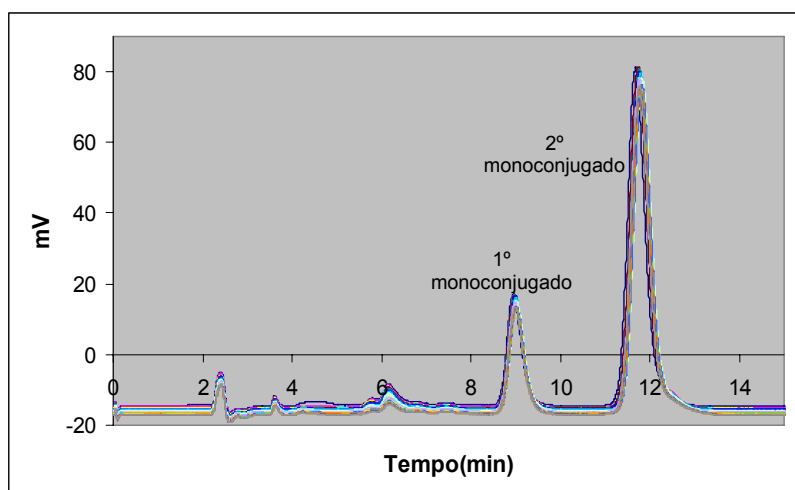


Figura 4.55 - Cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em tampão (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e sujeita ao processo de extracção pela alumina.

Procedeu-se, igualmente, à integração das áreas dos picos correspondentes aos aductos, calculando-se o respectivo valor médio e desvio padrão da área de cada pico permitindo, deste modo, o cálculo do correspondente coeficiente de variação ([Tabela 4.23](#)).

Tabela 4.23 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em tampão (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e sujeita ao processo de extracção pela alumina.

	1º Monoconjugado	2º Monoconjugado
Média	7,29E+05	2,78E+06
Desvio Padrão	1,36E+04	2,00E+04
CV (%)	1,87	0,72

Formatted Table

Pela análise dos coeficientes de variação obtidos nos estudos acima referidos (~~Tabela 4.22~~ e ~~Tabela 4.23~~) foi possível constatar uma excelente repetibilidade instrumental na presença de amostras preparadas em tampão, sujeitas e não sujeitas ao processo de extracção pela alumina ($CV < 2,5\%$).

Do mesmo modo, procedeu-se à avaliação da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em soro humano. Para o efeito, efectuou-se a seguinte mistura reaccional nesta matriz biológica: Soro + ADR 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR. Uma alíquota desta mistura não foi extraída e foi injectada vinte vezes no HPLC-ED nas mesmas condições cromatográficas, obtendo-se os cromatogramas ilustrados na ~~Figura 4.56~~.

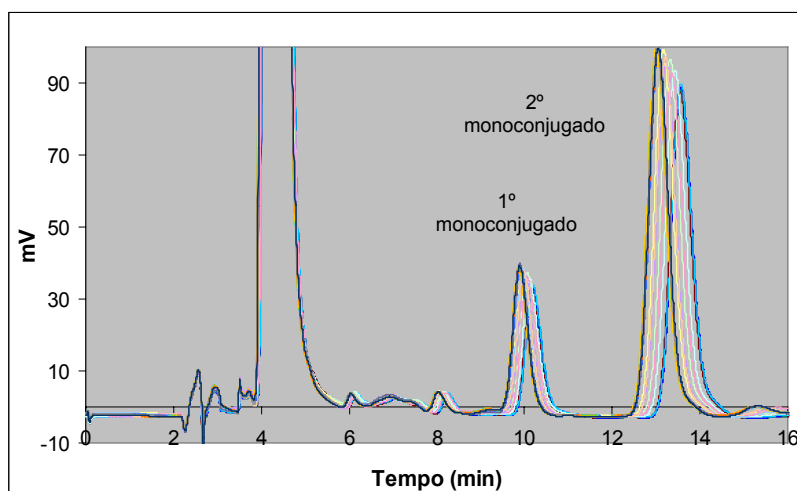


Figura 4.56 – Avaliação da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em soro humano (Soro + ADR 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR) e não sujeita ao processo de extracção pela alumina.

Após a integração das áreas dos picos correspondentes aos aductos detectados em cada cromatograma foi possível calcular o respectivo valor médio e desvio padrão da área de cada pico. Com base nesses valores foi possível avaliar a repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional não extraída efectuada em soro humano, através do correspondente coeficiente de variação (~~Tabela 4.24~~).

Tabela 4.24 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em soro humano (Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e não sujeita ao processo de extracção pela alumina.

	1º Monoconjugado	2º Monoconjugado
Média	9,80E+05	3,28E+06
Desvio Padrão	2,92E+04	5,64E+04
CV (%)	2,98	1,72

Formatted Table

Igualmente no decorrer do presente estudo, uma alíquota da mistura efectuada em soro humano foi submetida ao processo de extracção (com utilização de 2*150 μ L de PCA a 5% como solvente extractor) e, posteriormente, injectada vinte vezes no HPLC nas mesmas condições cromatográficas, obtendo-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.57](#).

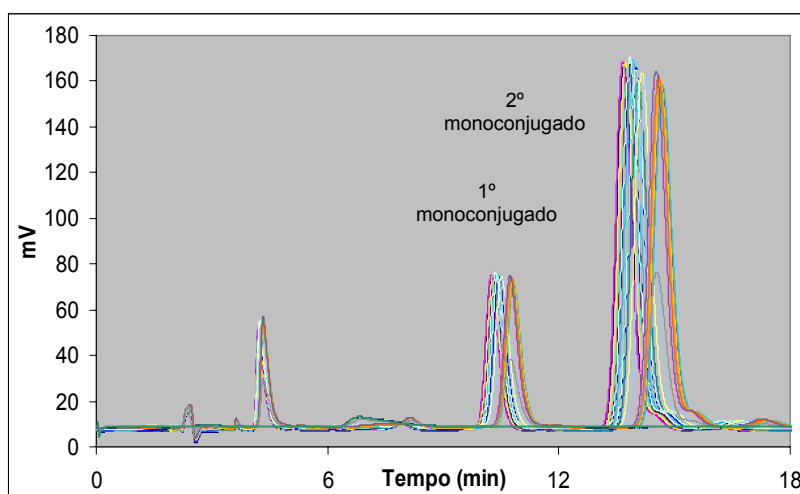


Figura 4.57 – Avaliação da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em soro humano (Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e sujeita ao processo de extracção pela alumina.

Mais uma vez, integraram-se as áreas dos picos correspondentes aos aductos detectados em cada cromatograma e procedeu-se ao cálculo do valor

médio e desvio padrão da área de cada pico. Com base nesses valores foi, deste modo, possível exprimir a repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em soro humano e extraída pela alumina, através do correspondente coeficiente de variação ([Tabela 4.25](#)~~Tabela 4.25~~).

Tabela 4.25 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade instrumental na presença de uma mistura reaccional efectuada em soro humano (Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) e sujeita ao processo de extracção pela alumina.

	1º Monoconjugado	2º Monoconjugado
Média	1,63E+06	5,06E+06
Desvio Padrão	2,68E+04	7,07E+04
CV (%)	1,64	1,40

Formatted Table

Tal como aconteceu no estudo de repetibilidade instrumental com misturas reaccionais efectuadas em tampão fosfato, também no estudo efectuado com misturas reaccionais em soro humano foi possível constatar uma excelente repetibilidade instrumental, quer na presença quer na ausência de processo extractivo (CV < 3%).

Convém, ainda, referir que em ambos os estudos efectuados foi possível obter uma melhor repetibilidade instrumental para amostras submetidas ao processo de extracção pela alumina, repetibilidade essa comprovada pelos menores coeficientes de variação obtidos.

Pela análise dos resultados obtidos no presente estudo foi possível constatar a elevada repetibilidade do equipamento de HPLC-ED face à injeção repetida de cada tipo de amostra acima utilizado. A elevada precisão do equipamento nas referidas condições de repetibilidade foi, deste modo, comprovada pelos reduzidos valores de CV obtidos para todas as amostras injectadas. Os valores de CV obtidos foram, deste modo, bastante inferiores ao limite máximo pré-estabelecido de 10% (242).

4.5.2.2. Repetibilidade do Procedimento Experimental Global

A precisão da metodologia proposta foi também avaliada em termos de repetibilidade do procedimento experimental global, desde a preparação das amostras até à sua injeção no sistema de HPLC-ED. A avaliação da precisão nessas condições de repetibilidade foi efectuada através da injeção de vinte misturas de reacção distintas, preparadas pelo mesmo operador e nas mesmas condições experimentais. Este parâmetro é também expresso em termos de coeficiente de variação (%) avaliando-se, deste modo, quer a preparação e extracção da amostra quer a técnica analítica em questão.

Este parâmetro foi, tal como o anterior, avaliado para misturas reaccionais efectuadas em tampão fosfato e em soro humano, submetidas e não submetidas ao processo de extracção pela alumina.

A avaliação da repetibilidade do procedimento experimental global em misturas reaccionais efectuadas em tampão envolveu a preparação de vinte amostras correspondentes à seguinte mistura reaccional: TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR. Cada mistura reaccional foi preparada no dobro do volume final (1500 μ L) para que parte fosse directamente injectada no equipamento de HPLC e parte (750 μ L) fosse submetida a um processo prévio de extracção. Deste modo, uma alíquota de cada uma das vinte misturas não foi extraída e foi injectada no HPLC-ED nas mesmas condições cromatográficas, obtendo-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.58](#)~~Figura 4.58~~ A. Uma outra alíquota (750 μ L) de cada uma dessas vinte misturas acima referidas foi submetida ao processo de extracção (utilizando 2*150 μ L de PCA a 5% como solvente extractor) e injectada no HPLC-ED nas mesmas condições cromatográficas, obtendo-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.58](#)~~Figura 4.58~~.

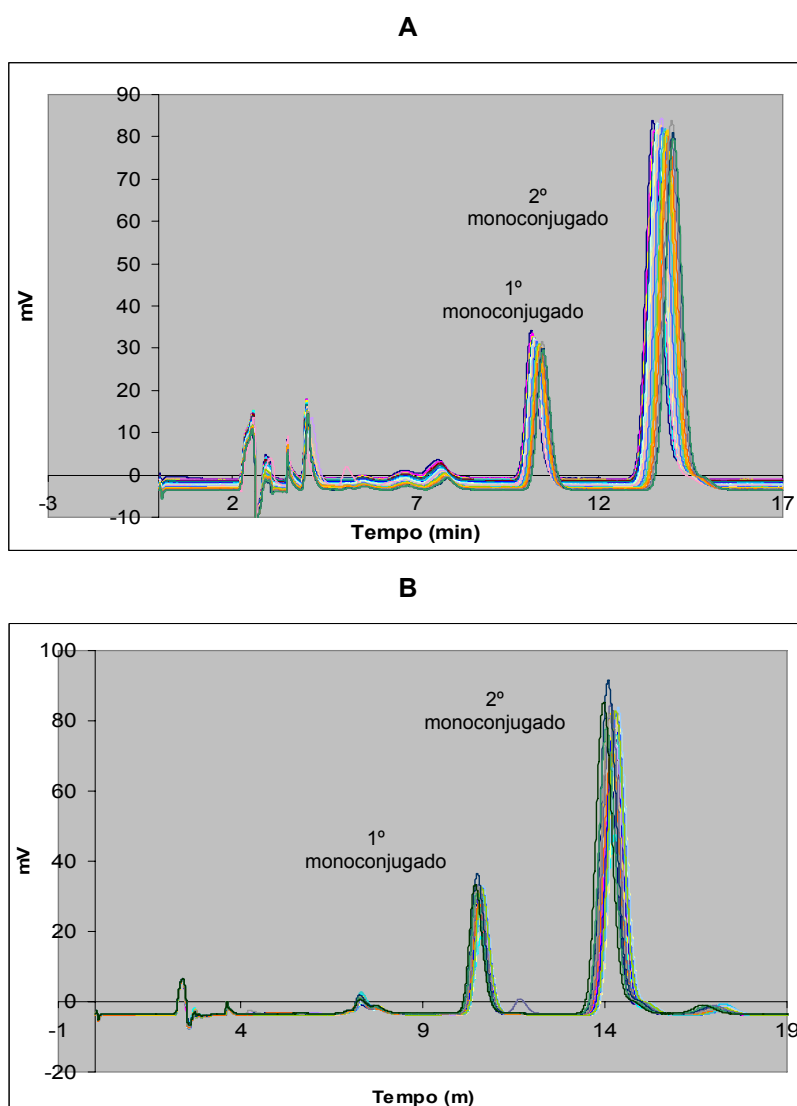


Figura 4.58 – Avaliação da repetibilidade do procedimento experimental global na presença de misturas reaccionais efectuadas em tampão fosfato (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) não sujeitas (A) e sujeitas (B) ao processo de extracção pela alumina.

Procedeu-se, de seguida, à integração das áreas dos dois picos detectados em cada cromatograma, calculando-se o respectivo valor médio e desvio padrão da área de cada pico permitindo, assim, o cálculo do correspondente coeficiente de variação ([Tabela 4.26](#)~~Tabela 4.26~~).

Tabela 4.26 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade do procedimento experimental global na presença de misturas reacionais efectuadas em tampão fosfato (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR), não sujeitas e sujeitas ao processo de extracção pela alumina.

	1º Monoconjugado	2º Monoconjugado
Amostras não extraídas		
Média	8,49E+05	2,76E+06
Desvio Padrão	1,04E+04	3,82E+04
CV (%)	1,24	1,38
Amostras extraídas		
Média	8,89E+05	2,78E+06
Desvio Padrão	4,77E+04	1,55E+05
CV (%)	5,36	5,57

Pela análise da [Tabela 4.26](#) foi possível constatar a excelente repetibilidade do procedimento experimental global manifestada pelos baixos coeficientes de variação obtidos. De salientar que os resultados evidenciaram uma maior variabilidade nas amostras sujeitas ao processo extractivo, que poderá resultar da maior manipulação destas amostras. No entanto, os valores de coeficiente de variação são perfeitamente aceitáveis, não pondo em causa o processo extractivo.

Do mesmo modo, procedeu-se à avaliação da repetibilidade do procedimento experimental global para a presença de aductos em soro humano. Para o efeito, efectuaram-se 20 misturas reacionais para esta matriz biológica (Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR). Uma alíquota de cada mistura não foi extraída e foi injectada no HPLC-ED nas mesmas condições cromatográficas, obtendo-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.59](#)-A. Uma outra alíquota (750 μ L) de cada uma das vinte misturas acima referidas foi submetida ao processo de extracção (utilizando 2*150 μ L de PCA a 5% como solvente extractor) e injectada no HPLC-ED nas mesmas condições cromatográficas, obtendo-se os cromatogramas ilustrados na [Figura 4.59](#)-B.

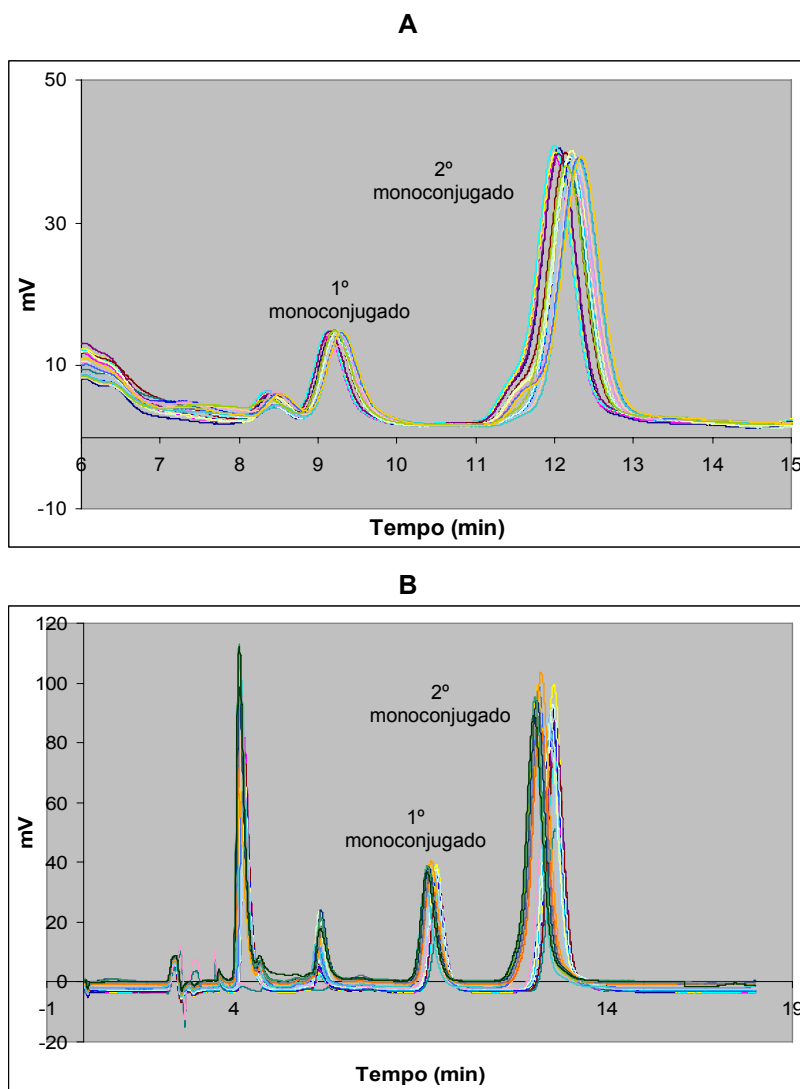


Figura 4.59 - Avaliação da repetibilidade do procedimento experimental global na presença de misturas reaccionais efectuadas em soro humano (Soro + ADR $4\ \mu\text{M}$ + GSH $0,5\ \text{mM}$ + TIR) não sujeitas (A) e sujeitas (B) e ao processo de extracção pela alumina.

Tal como tinha sido já efectuado para as misturas reaccionais preparadas em tampão fosfato, procedeu-se à integração das áreas dos dois picos detectados em cada cromatograma, calculando-se o respectivo valor médio e

desvio padrão da área de cada pico permitindo, deste modo, o cálculo do correspondente coeficiente de variação ([Tabela 4.27](#)).

Tabela 4.27 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da repetibilidade do procedimento experimental global na presença de misturas reacionais efectuadas em soro humano (Soro + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR), não sujeitas e sujeitas ao processo de extracção pela alumina.

	1º Monoconjugado	2º Monoconjugado
Amostras não extraídas		
Média	3,26E+05	1,46E+06
Desvio Padrão	1,35E+04	7,15E+04
CV (%)	4,16	4,90
Amostras extraídas		
Média	9,95E+05	3,07E+06
Desvio Padrão	3,33E+04	1,51E+05
CV (%)	3,35	4,92

Pela análise da [Tabela 4.27](#) foi possível constatar a excelente repetibilidade do procedimento experimental global manifestada pelos baixos coeficientes de variação obtidos (CV < 5%). Contudo, ao contrário do que sucedeu com o estudo efectuado com misturas efectuadas em tampão, os valores de coeficiente de variação obtidos foram idênticos para as amostras submetidas e não submetidas ao processo de extracção.

Deste modo, com base nos estudos acima efectuados foi possível constatar a elevada precisão do método em condições de repetibilidade. Tal como referido, o valor da precisão é geralmente expresso em termos de imprecisão e normalmente calcula-se sob a forma de desvio padrão do resultado do ensaio. Uma maior precisão é indicada através de um reduzido desvio padrão (242), precisão essa comprovada no presente estudo pelos reduzidos valores de CV

obtidos no presente estudo, os quais foram inferiores ao limite inicialmente estabelecido como limite máximo (10%) (242). Por conseguinte, o presente método caracteriza-se por possuir uma elevada precisão dado o grau de concordância entre os resultados obtidos através da aplicação repetida do método experimental nas condições analíticas determinadas (mesmo operador, mesmo material e utensílios, mesmo laboratório e curtos intervalos de tempo).

4.5.2.3. Precisão Intermédia

A precisão intermédia corresponde a um dos níveis em que a precisão de uma determinada metodologia pode ser avaliada e expressa variações intra-laboratoriais em dias diferentes, por analistas diferentes ou equipamentos diferentes (247, 248, 250). Este parâmetro é, tal como os anteriores, expresso em termos de coeficiente de variação (%CV) ou seja, quanto maior esse coeficiente menor a precisão intermédia do método. A extensão com a qual se deve estabelecer a precisão intermédia depende das circunstâncias sob as quais se pretende utilizar o procedimento. A precisão intermédia poderá corresponder à precisão inter-dia, ao longo de 3 ou mais dias, ou seja, poderá ser avaliada em termos de variações intra-laboratoriais em que o parâmetro que varia é o tempo.

No âmbito do presente estudo de validação, a avaliação da precisão intermédia foi efectuada através de um estudo efectuado em cinco dias consecutivos, o qual permitiu, deste modo, a avaliação das variações intra-laboratório e inter-dia. Para o efeito, efectuaram-se cinco réplicas de uma mistura reaccional (preparada em tampão fosfato) contendo aductos da ADR com a GSH (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR) as quais foram injectadas (20 μ L) no sistema de HPLC-ED, nas mesmas condições cromatográficas, ao longo de cinco dias diferentes e consecutivos sendo que, durante o período de análise, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente. Ou seja, para cada dia foram injectadas as 5 réplicas da referida mistura reaccional as quais foram re-injectadas, nas mesmas condições cromatográficas, ao longo de cinco dias

consecutivos. Os respectivos cromatogramas foram obtidos por detecção electroquímica (resultados não apresentados).

Após obtenção dos respectivos cromatogramas procedeu-se à integração das áreas dos picos detectados e ao cálculo dos respectivos valores médios da área de cada pico para cada dia. Esses valores médios, assim como os respectivos desvios padrão e coeficientes de variação, encontram-se representados na [Tabela 4.28](#).

Tabela 4.28 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da precisão intermédia na presença de misturas reaccionais efectuadas em tampão fosfato (TP + ADR 4 μ M + GSH 0,5 mM + TIR), mantidas à temperatura ambiente e injectadas ao longo de cinco dias consecutivos.

Dia	Área Média do Pico do 1º Monoconjugado	Área Média do Pico do 2º Monoconjugado
1	4,14E+05	1,47E+06
2	4,22E+05	1,48E+06
3	4,19E+05	1,41E+06
4	4,55E+05	1,51E+06
5	4,32E+05	1,31E+06
Média (5 dias de estudo)	4,29E+05	1,43E+06
Desvio Padrão	1,64E+04	7,90E+04
Coeficiente de Variação (%)	3,82	5,51

Pela análise da [Tabela 4.28](#) foi possível constatar a excelente precisão intermédia da metodologia dado os baixos coeficientes de variação obtidos no presente estudo. Deste modo, os coeficientes de variação obtidos foram muitos reduzidos e enquadram-se perfeitamente no intervalo definido inicialmente como intervalo que permite inferir a boa precisão intermédia do método analítico (CV<10%) (242). Deste modo, no futuro, impõe-se a avaliação

da precisão intermédia fazendo variar outros parâmetros como, por exemplo, o operador e o equipamento de HPLC utilizado.

De salientar que o presente estudo de precisão intermédia reforçou os resultados de estabilidade obtidos para estes compostos à temperatura ambiente, após a interrupção da reacção pela adição de PCA ([Tabela 4.5](#)~~Tabela 4.5~~).

Uma vez que se constatou a elevada estabilidade dos aductos nas condições testadas não foi efectuado o estudo da precisão intermédia para amostras extraídas e para misturas reaccionais preparadas em soro humano. Os excelentes resultados obtidos com as misturas reaccionais preparadas em tampão fosfato e injectadas directamente no sistema de HPLC-ED e a comprovada estabilidade (a pH ácido) fazem prever que este parâmetro não será significativamente afectado pela extracção ou mudança da matriz reaccional.

4.5.3 Linearidade e Calibração

A linearidade da resposta consiste no intervalo dentro do qual existe uma relação linear entre o teor da substância a analisar (aductos da adrenalina com a GSH) e a área do pico detectado no cromatograma obtido por detecção electroquímica. Este parâmetro pode ser avaliado pela análise de um gráfico produzido por regressão linear das respostas nas concentrações de calibração apropriadas. São necessárias réplicas de medições para obter uma estimativa de erro puro, se não existir nenhuma estimativa independente. Para o estabelecimento de linearidade é recomendado um mínimo de 5 concentrações, incluindo um branco. Os padrões de calibração devem ser analisados, pelo menos, em duplicado, e preferivelmente em triplicado ou mais, numa ordem fortuita.

Os procedimentos que serão de seguida descritos relacionam-se com estudos de calibração em validação, que são necessariamente mais exactos que a calibração empreendida durante uma análise rotineira, tal como a discutida em 4.3.1.

No que respeita ao estudo da linearidade efectuado no âmbito da validação da metodologia para detecção de aductos da ADR com a GSH recorreu-se ao método da curva de calibração, correspondendo a linearidade da resposta ao intervalo linear da curva de calibração. Para o efeito, elegeu-se uma gama de concentrações de ADR nas misturas de reacção entre 0 e 175 μM . Foram efectuadas 4 réplicas de cada concentração (0; 1,4; 7; 35 e 175 μM) e, após a sua injeção (20 μL), foram obtidos, por detecção electroquímica, os respectivos cromatogramas. Após a análise dos referidos cromatogramas procedeu-se à integração das áreas dos picos correspondentes aos aductos formados. A curva de calibração é representada pela média das áreas dos picos das 4 réplicas para cada concentração. De salientar que o presente estudo foi efectuado para misturas reaccionais efectuadas em tampão (TP + ADR 0 a 175 μM + GSH 0,5 mM + TIR) e soro humano (Soro + ADR 0 a 175 μM + GSH 0,5 mM + TIR), submetidas e não submetidas ao processo de extracção pela alumina. As amostras em branco (TP ou Soro + ADR 0 μM + GSH 0,5 mM + TIR) correspondem a misturas reaccionais sem ADR, mantendo os restantes componentes da mistura (a solução de ADR é, neste caso, substituída por tampão fosfato).

A linearidade foi inicialmente testada utilizando misturas reaccionais efectuadas em tampão fosfato (TP + ADR 0; 1,4; 7; 35 e 175 μM + GSH 0,5 mM + TIR) não sujeitas ao processo de extracção pela alumina. Após injeção de 20 μL de cada amostra no sistema de HPLC-ED foram obtidos os cromatogramas correspondentes e integradas as áreas dos picos dos monoconjugados. Foi, posteriormente, calculado o valor médio da área de cada pico em cada nível de concentração ([Tabela 4.29](#)~~Tabela 4.29~~).

Tabela 4.29 - Área média dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da linearidade da resposta do detector face à presença de misturas reaccionais efectuadas em tampão fosfato com diferentes concentrações de adrenalina (TP + ADR 0 a 175 μM + GSH 0,5 mM + TIR) não sujeitas ao processo de extracção pela alumina.

Concentração (μM)	Área média do 1º Monoconjugado	Área média do 2º Monoconjugado
0	0,00E+00	0,00E+00
1,4	1,49E+05 \pm 2,21E+03	5,19E+05 \pm 6,01E+03
7	7,20E+05 \pm 2,52E+03	2,54E+06 \pm 1,13E+04
35	3,58E+06 \pm 1,37E+04	1,26E+07 \pm 4,47E+04
175	1,65E+07 \pm 2,29E+05	4,81E+07 \pm 5,02E+05

Com base nos valores médios de área obtidos para cada concentração foi construída, para cada pico, a respectiva curva de calibração da área média do pico *versus* concentração final de ADR na mistura reaccional ([Figura 4.60](#)Figura 4.60).

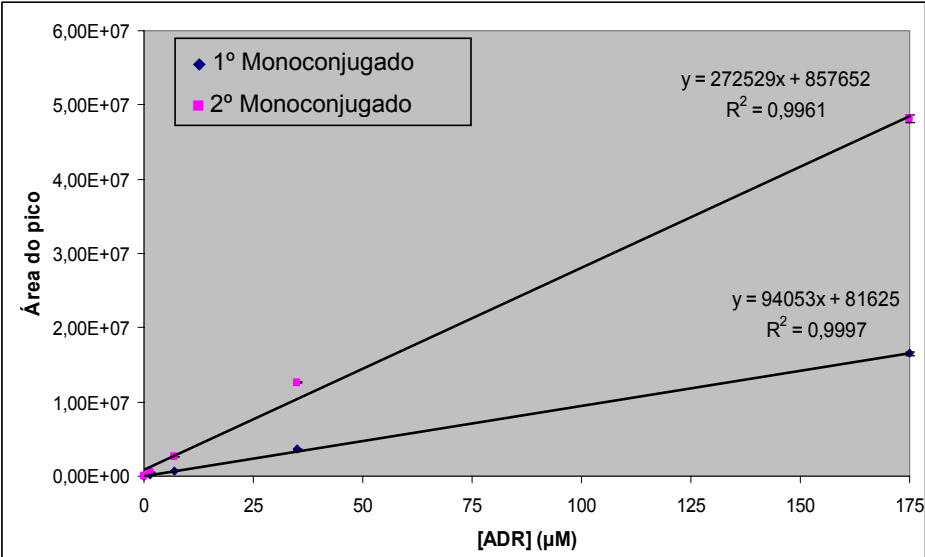


Figura 4.60 - Curvas de calibração do valor médio da área de cada pico em função da concentração de adrenalina na mistura de reacção (TP + ADR 0 a 175 μM + GSH 0,5 mM + TIR) não sujeita ao processo de extracção.

Pela análise da [Figura 4.60](#) foi possível constatar que o detector responde de forma linear à presença destes dois compostos em função da concentração final de ADR na mistura de reacção.

O presente estudo de linearidade foi, igualmente, efectuado submetendo uma alíquota (750 μL) de cada amostra acima testada (TP + ADR 0; 1,4; 7; 35 e 175 μM + GSH 0,5 mM + TIR) ao processo de extracção pela alumina (utilização de 2*150 μL de PCA a 5% como solvente extractor). Após a injeção das alíquotas extraídas (20 μL) no sistema de HPLC-ED determinou-se, com base na análise dos cromatogramas correspondentes, o valor médio da área de cada pico em cada nível de concentração ([Tabela 4.30](#)).

Tabela 4.30 - Área média dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da linearidade da resposta do detector face à presença de misturas reaccionais efectuadas em tampão fosfato com diferentes concentrações de adrenalina (TP + ADR 0 a 175 μM + GSH 0,5 mM + TIR) sujeitas ao processo de extracção pela alumina.

Concentração (μM)	Área média do 1º Monoconjugado	Área média do 2º Monoconjugado
0	81625	857652
25	2401625	6966122
50	4803250	13932244
75	7204875	20898366
100	9606500	27864488
125	12008125	34830610
150	14409750	41796732
175	16811375	48762854

Formatted Table

0	0,00E+00	0,00E+00
1,4	1,15E+05 ± 1,89E+04	3,65E+05 ± 7,17E+04
7	5,35E+05 ± 1,67E+04	1,74E+06 ± 6,85E+04
35	3,09E+06 ± 1,32E+05	1,03E+07 ± 4,54E+05
175	1,28E+07 ± 1,82E+05	3,96E+07 ± 1,11E+05

Com base nos valores médios de área obtidos para cada concentração foi construída, para cada pico, a respectiva curva de calibração da área média do pico *versus* concentração de ADR na mistura reaccional (0 a 175 µM) ([Figura 4.61](#) ~~Figura 4.64~~).

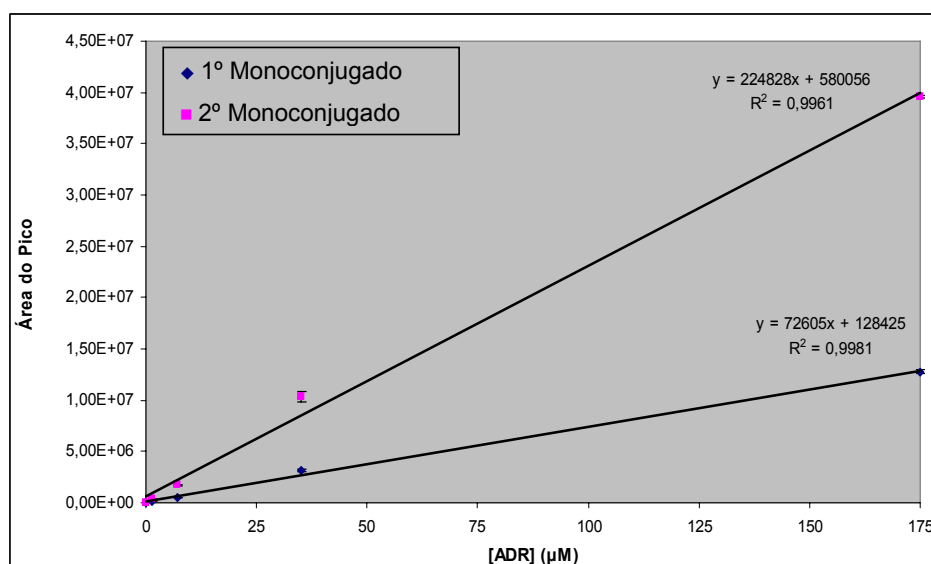


Figura 4.61 - Curvas de calibração do valor médio da área de cada pico em função da concentração de adrenalina na mistura de reacção (TP + ADR 0 a 175µM + GSH 0,5 mM + TIR) sujeita ao processo de extracção.

Tal como sucedeu para amostras não sujeitas ao processo de extracção, foi possível comprovar a linearidade da resposta do detector em função da concentração de ADR e, consequentemente, da quantidade de aductos presentes no eluído da coluna cromatográfica.

O presente estudo de linearidade foi, igualmente, efectuado utilizando misturas reaccionais efectuadas em soro humano (Soro + ADR 0; 1,4; 7; 35 e 175 μM + GSH 0,5 mM + TIR), sujeitas e não sujeitas ao processo de extracção pela alumina. Procedeu-se, deste modo, à preparação de misturas reaccionais com diferentes concentrações finais de ADR em uma alíquota desta mistura foi directamente injectada no HPLC-ED e outra alíquota (750 μL) foi submetida ao processo extractivo (utilização de 2*150 μL de PCA a 5% como solvente extractor). Após injeção de 20 μL de cada amostra (Soro + ADR 0 a 175 μM + GSH 0,5 mM + TIR) no sistema de HPLC-ED foram obtidos os cromatogramas correspondentes e integradas as áreas dos picos dos monoconjugados. Foi, posteriormente, calculado o valor médio da área de cada pico em cada nível de concentração (Tabela 4.31Tabela 4.31).

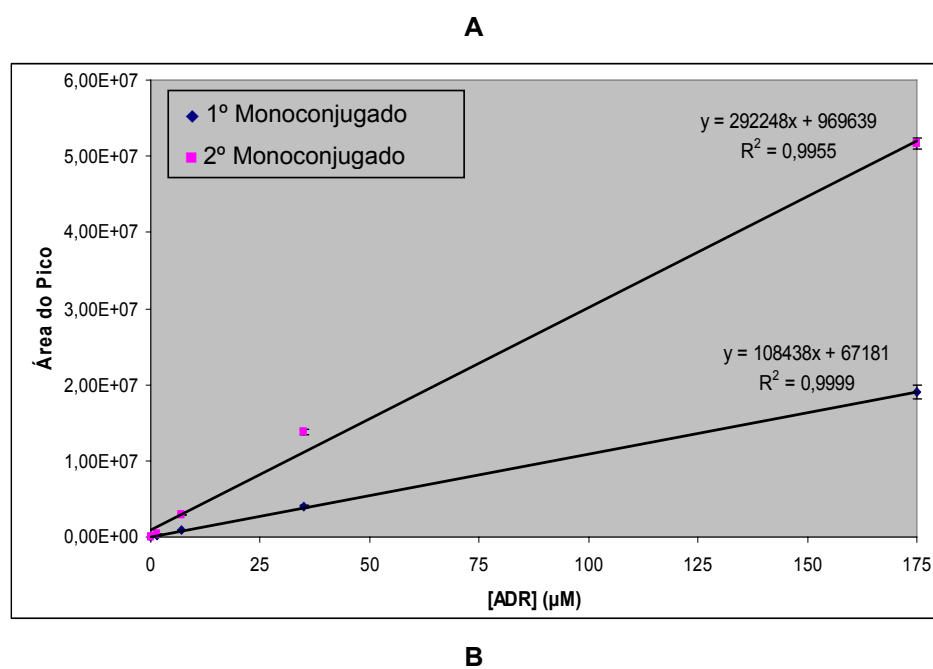
Tabela 4.31 - Área média dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da linearidade da resposta do detector face à presença de misturas reaccionais efectuadas em soro humano com diferentes concentrações de adrenalina (Soro + ADR 0 a 175 μM + GSH 0,5 mM + TIR), sujeitas e não sujeitas ao processo de extracção pela alumina.

Concentração (μM)	Área média do 1º Monoconjugado	Área média do 2º Monoconjugado
Amostras não extraídas		
0	0,00E+00	0,00E+00
1,4	1,62E+05 \pm 1,92E+03	4,17E+05 \pm 1,13E+04
7	8,44E+05 \pm 4,78E+03	2,90E+06 \pm 1,01E+04
35	4,00E+06 \pm 1,26E+05	1,37E+07 \pm 3,88E+05
175	1,90E+07 \pm 8,53E+05	5,16E+07 \pm 7,24E+05
Amostras extraídas		
0	0,00E+00	0,00E+00
1,4	6,38E+03 \pm 1,40E+03	4,78E+04 \pm 2,41E+03
7	3,31E+05 \pm 2,04E+04	8,41E+05 \pm 5,28E+04
35	2,51E+06 \pm 7,86E+04	7,44E+06 \pm 2,68E+05

Formatted Table

175	$1,43\text{E}+07 \pm 1,52\text{E}+06$	$4,11\text{E}+07 \pm 2,67\text{E}+06$
-----	---------------------------------------	---------------------------------------

Foram, posteriormente, construídas as respectivas curvas de calibração tendo por base a concentração final de ADR e os valores médios de áreas obtidos (Figura 4.62Figura 4.62).



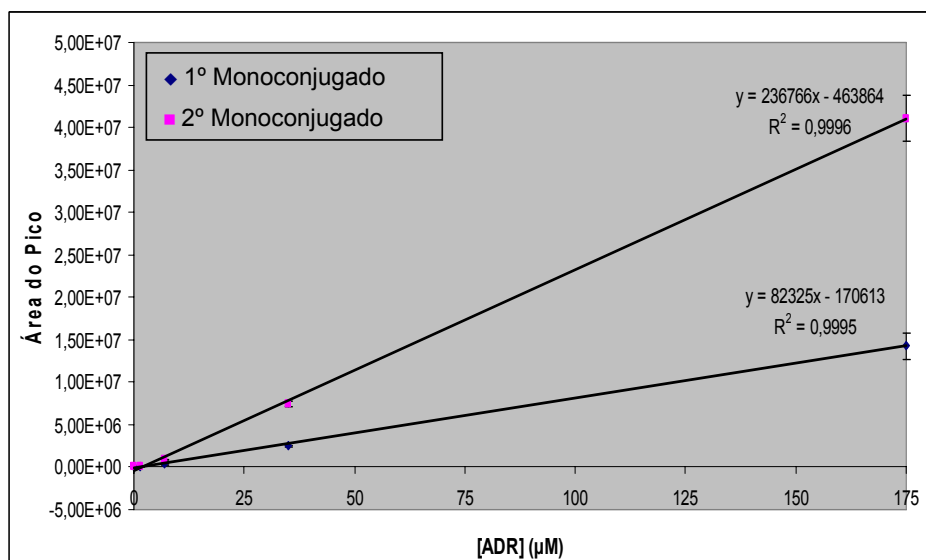


Figura 4.62 - Curvas de calibração do valor médio da área de cada pico em função da concentração de adrenalina na mistura de reacção (Soro + ADR 0 a 175 μM + GSH 0,5 mM + TIR). A – amostras não submetidas a extracção. B – amostras submetidas ao processo de extracção pela alumina.

Pela análise da [Figura 4.62](#) foi possível comprovar, igualmente, a linearidade da resposta do detector em função da concentração de ADR e, consequentemente, da quantidade de aductos presentes no eluído da coluna cromatográfica. Essa linearidade é comprovada para misturas reaccionais efectuadas em soro humano não sujeitas (A) e sujeitas (B) ao processo de extracção. Desta forma comprova-se que o processo de extracção, apesar da manipulação das amostras, permite a manutenção da linearidade da resposta revelando, deste modo, a existência de uma proporcionalidade entre a quantidade de compostos extraída pelo referido processo de extracção e a concentração final de ADR na mistura reaccional.

O estudo de linearidade foi repetido para misturas reaccionais preparadas em soro humano sujeitas ao processo de extracção pela alumina, com uma diferente gama de concentrações de ADR na mistura reaccional. Deste modo, foi seleccionada uma gama inferior de concentrações, mais próxima do que será de esperar a nível biológico (0 a 4 μM) (230). Para o efeito, foram efectuadas

diversas misturas reaccionais com diferentes concentrações de ADR, nomeadamente: 0; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 4 μM . O presente estudo foi efectuado em triplicado, ou seja, para cada concentração testada foram efectuadas três misturas reaccionais. Uma alíquota (750 μL) de cada amostra acima referida foi submetida ao processo de extracção pela alumina e injectada (20 μL) no sistema de HPLC-ED, nas mesmas condições cromatográficas. Após a referida injeção das alíquotas extraídas determinou-se, com base na análise dos cromatogramas correspondentes, o valor médio da área de cada pico em cada nível de concentração ([Tabela 4.32](#) ~~Tabela 4.32~~).

Tabela 4.32 - Área média dos picos detectados nos cromatogramas obtidos durante o estudo da linearidade da resposta do detector face à presença de misturas reaccionais efectuadas em soro humano com diferentes concentrações de adrenalina (Soro + ADR 0 a 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR), sujeitas ao processo de extracção pela alumina.

Concentração (μM)	Área média do 1º Monoconjugado	Área média do 2º Monoconjugado
0	0	0
0,0125	-	4,01E+03 \pm 1,79E+02
0,025	-	7,28E+03 \pm 4,91E+02
0,05	-	1,49E+04 \pm 9,51E+02
0,1	5,78 E+03 \pm 4,80E+02	2,95E+04 \pm 1,56E+03
0,2	7,30E+03 \pm 2,70E+02	4,22E+04 \pm 2,27E+03
0,4	1,73E+04 \pm 9,73E+02	9,12E+04 \pm 2,43E+03
0,8	3,20E+04 \pm 2,21E+03	1,29E+05 \pm 1,86E+04

Formatted Table

4

 $1,48\text{E}+05 \pm 1,04\text{E}+04$ $6,45\text{E}+05 \pm 1,14\text{E}+04$

Com base nos resultados acima ilustrados foram construídas as curvas de calibração de cada monoconjugado da ADR com a GSH, representando a área média de cada pico em função da concentração final de adrenalina na mistura reaccional (Figura 4.63).

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

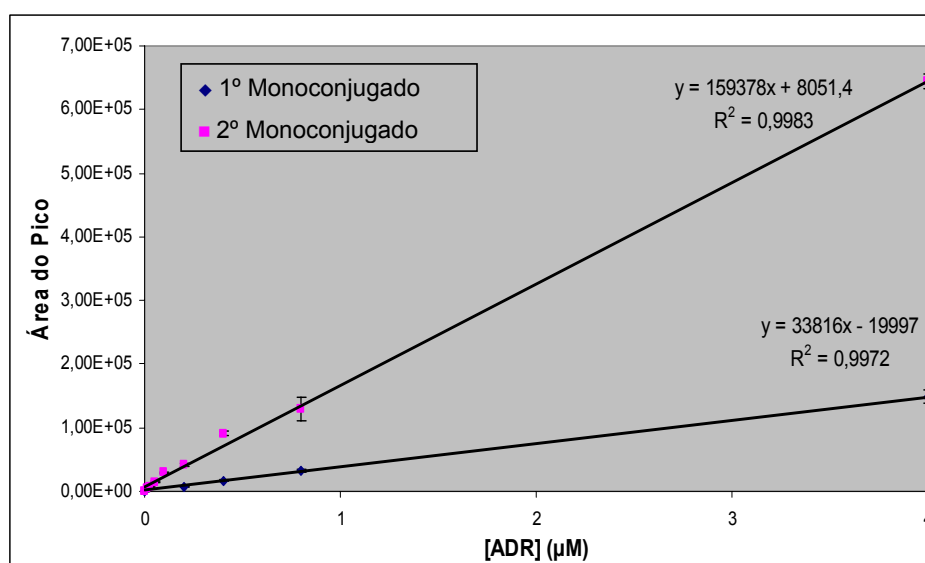


Figura 4.63 - Curvas de calibração do valor médio da área de cada pico em função da concentração de adrenalina na mistura de reacção (Soro + ADR 0 a 4 µM + GSH 0,5mM + TIR) sujeita ao processo de extracção.

Pela análise da Figura 4.63 foi possível comprovar, mais uma vez, a linearidade da resposta do detector em função da concentração de ADR na mistura reaccional e, consequentemente, da quantidade de aductos injectada na coluna cromatográfica. Deste modo, confirma-se que a referida linearidade se verifica, igualmente, para concentrações inferiores de catecolamina na mistura reaccional, concentrações essas mais próximas do esperado a nível biológico (230). De salientar que, relativamente ao primeiro monoconjugado, não foram consideradas as concentrações 0,0125; 0,025 e 0,05 µM, uma vez que, nestas concentrações, não é possível detectar a presença deste aducto nos respectivos

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

cromatogramas. Por outro lado, não foi igualmente considerada a concentração 0,1 μM uma vez que esta concentração já não se encontra dentro da gama de resposta linear do detector face à presença deste composto na coluna cromatográfica.

Uma relação linear deve ser, assim, avaliada na gama do procedimento analítico e a linearidade deve ser avaliada por análise visual de um gráfico de sinais como função da concentração de analito. Se existir uma relação linear, os resultados do ensaio devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados, como, por exemplo, a avaliação por cálculo de uma linha de regressão, tal como efectuado no presente estudo. A linearidade da resposta foi comprovada pelos resultados obtidos e consiste, deste modo, no intervalo dentro do qual existe uma relação linear entre o teor da substância a analisar (monoconjugados da ADR com a GSH) e a magnitude do sinal produzido pelo instrumento de medição (detector electroquímico). Por último, é de salientar que em todas as situações de linearidade testadas foram utilizadas misturas de reacção contendo 0,5 mM de ADR mas, após integração das áreas dos picos, foi possível constatar que esta concentração não se enquadrava dentro do intervalo de resposta linear do detector. Por esta razão, não se incluiu este valor de concentração na respectiva curva de calibração

4.5.4 Limite de Detecção

O limite de detecção define-se como o teor mínimo detectado a partir do qual se pode deduzir a presença da substância a analisar com uma certeza estatística razoável. Existem várias formas de determinação deste limite. No presente estudo, dada a ausência de picos com tempo de retenção idêntico ao dos aductos na amostra branco, o método utilizado para a determinação do limite de detecção baseou-se na avaliação visual de cromatogramas correspondentes a misturas reaccionais com concentrações decrescentes de adrenalina. Assim, o limite de detecção foi determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e estabelecendo o nível mínimo ao qual o analito pôde ser

detectado com confiança. Dada a inexistência dos padrões dos aductos, os limites de detecção aqui apresentados referem-se à quantidade mínima de adrenalina que após reacção permitiu a detecção dos referidos aductos.

Tendo em conta a comprovada diferença entre as quantidades formadas de cada um dos dois aductos na mistura reaccional, tornou-se lógico o estabelecimento do limite de detecção para cada pico. Para o efeito, injectaram-se misturas reaccionais efectuadas em soro humano que foram sujeitas ou não ao processo de extracção pela alumina.

Deste modo, foram efectuadas misturas reaccionais nas quais a concentração de ADR decrescia gradualmente, desde 0,8 μM (corresponde à mais baixa concentração da curva de calibração), até 3,3 nM (Soro + ADR 0,8 μM a 3,3 nM + GSH 0,5 mM + TIR). As várias misturas reaccionais, sujeitas e não sujeitas ao processo de extracção, foram injectadas no HPLC (20 μL) nas mesmas condições cromatográficas e os respectivos cromatogramas obtidos por detecção electroquímica. O limite de detecção foi, então, determinado pelo método da avaliação visual mediante a análise dos cromatogramas correspondentes a amostras com concentrações conhecidas de analito. Deste modo, por exemplo, nas amostras sujeitas ao processo de extracção, o limite no qual os dois compostos (monoconjugados) foram detectados com confiança foi de 0,1 e 0,0033 μM . Uma vez que o limite de detecção deve ser expresso em termos de quantidade de composto presente na coluna (e não de concentração) efectuou-se a conversão da molaridade para a quantidade (pmol) presente nos 20 μL injectados no HPLC-ED ([Tabela 4.33](#) ~~Tabela 4.33~~).

Tabela 4.33 - Limites de detecção dos monoconjugados presentes em misturas reaccionais efectuadas em soro humano sujeitas e não sujeitas ao processo de extracção pela alumina, expressos em quantidade de adrenalina presente na mistura reaccional.

	1º Monoconjugado (pmol)	2º Monoconjugado (pmol)
Sem extracção	8	0,25
Com extracção	2	0,066

Na ~~Figura 4.64~~Figura 4.64 podem-se observar os cromatogramas obtidos para as concentrações de ADR estabelecidas como valores mínimos para os quais foi possível detectar os referidos compostos presentes na mistura reaccional (A-ADR 0,1 μM ; B-ADR 0,0033 μM).

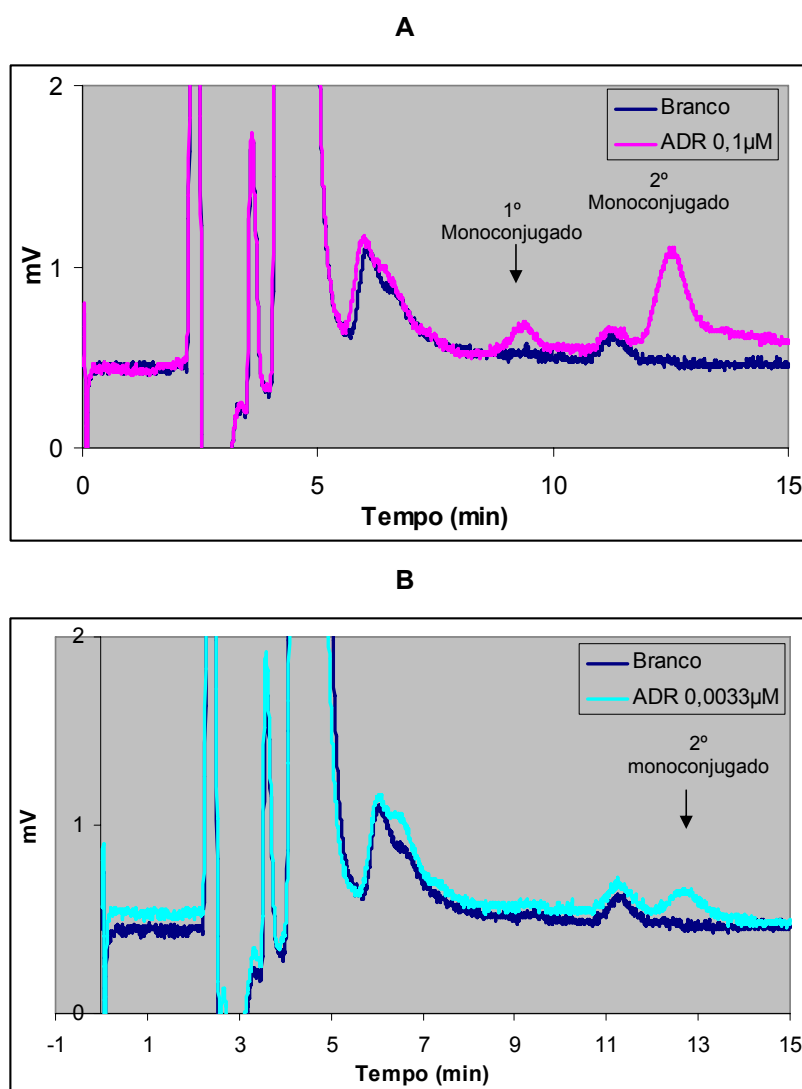


Figura 4.64 - Limite de detecção dos monoconjugados da adrenalina com a GSH em misturas reaccionais submetidas ao processo de extracção pela alumina. A – 1º monoconjugado. B – 2º monoconjugado.

Pela análise da [Figura 4.64](#) tornou-se evidente que se pode definir a presença dos referidos compostos nas misturas reaccionais, nas concentrações de ADR descritas. Contudo, torna-se necessário efectuar um estudo adicional no sentido de permitir a definição segura e com confiança desse valor de concentração como o limite de detecção do composto. Para o efeito, foram efectuadas 20 injeções de misturas reaccionais contendo a concentração de ADR previamente definida. Considera-se o valor do limite de detecção seguro e de confiança quando a média das áreas dos picos detectados for sempre superior ao triplo do respectivo desvio padrão. Deste modo, no caso do limite de detecção estabelecido para o 1º e 2º aducto em amostras extraídas procedeu-se a 20 injeções de misturas reaccionais efectuadas em soro humano contendo uma concentração de ADR de 0,1 µM e 0,0033 µM (3,3 nM), respectivamente. Estas amostras foram sujeitas ao referido processo de extracção. Após a análise dos cromatogramas obtidos efectuou-se a integração da área dos picos detectados nos respectivos cromatogramas, as quais se encontram ilustradas na

[Tabela 4.34](#) ~~Tabela 4.34~~.

Tabela 4.34 - Valores de área do pico correspondente ao 1º e 2º monoconjugado obtidos durante o estudo de validação do limite de detecção (Soro + ADR 0,1 µM + GSH 0,5 mM + TIR e Soro + ADR 3,3 nM + GSH 0,5 mM + TIR).

Área do pico do 1º Monoconjugado nas 20 injeções		Área do pico do 2º Monoconjugado nas 20 injeções	
4,10E+03	4,41E+03	6,19E+03	6,19E+03
4,15E+03	4,35E+03	5,73E+03	5,73E+03
4,25E+03	4,47E+03	5,97E+03	5,97E+03
4,34E+03	4,34E+03	5,90E+03	5,90E+03
4,17E+03	4,35E+03	6,54E+03	6,54E+03
4,64E+03	4,23E+03	5,54E+03	5,54E+03

4,57E+03	4,58E+03	6,42E+03	6,42E+03
4,64E+03	4,36E+03	5,90E+03	5,90E+03
4,20E+03	4,35E+03	6,26E+03	6,26E+03
4,40E+03	4,40E+03	5,94E+03	5,94E+03
Média	4,38E+03	Média	6,13E+03
Desvio padrão (SD)	1,50E+02	Desvio padrão (SD)	2,68E+02
3*SD	4,49E+02	3*SD	8,03E+02

Formatted Table

Pela análise da [Tabela 4.34](#) foi possível depreender que o valor de 2 pmol (que corresponde a uma concentração de 0,1 µM) e o valor de 0.066 pmol (que corresponde a uma concentração de 3,3 nM) de ADR podem ser estabelecidos como os limites mínimos desta catecolamina que permitem a detecção do 1º e 2º monoconjugados, respectivamente, em misturas reacionais efectuadas em soro humano e submetidas ao processo de extracção pela alumina.

O referido estudo de validação do limite de detecção foi, igualmente, efectuado para os dois aductos em misturas reacionais não extraídas. Os resultados, apesar de não estarem ilustrados, confirmaram os valores apresentados na [Tabela 4.33](#) como os limites de ADR que permitem a detecção de cada um dos aductos. Deste modo, em função dos resultados obtidos para os limites de detecção em amostras extraídas pela alumina e pela análise da referida tabela, é possível constatar a capacidade de concentração das amostras quando estas são sujeitas ao processo de extracção, permitindo o estabelecimento de limites de detecção 4 vezes inferiores.

Estes valores obtidos para os limites de detecção podem ser considerados elevados relativamente aos níveis fisiológicos de catecolaminas. De facto, em indivíduos saudáveis os níveis plasmáticos fisiológicos de ADR são extremamente reduzidos (0,2 nM) e substancialmente inferiores aos níveis plasmáticos de NA (1 nM) (230). Contudo, em diversas situações patológicas (como por exemplo, hipoglicémia, hipotensão hemorrágica, asfixia, colapso circulatório, nutrição hipercalórica e stress emocional) os níveis de ADR podem aumentar marcadamente e em maior extensão do que os níveis de NA, reflectindo,

presumivelmente, uma maior activação hormonal adrenomedular comparativamente com a activação neuronal simpática (56, 230, 251). Outro exemplo de patologia associada ao aumento dos níveis de catecolaminas é o caso dos feocromocitomas, tumores que produzem, armazenam e excretam catecolaminas. Estes tumores estão na origem de uma síndrome clínica grave, caracterizada por hipertensão severa associada a complicações cardíacas (74, 252). Como consequência do aparecimento deste tipo de tumores, os níveis circulatórios de catecolaminas aumentam acentuadamente, podendo atingir concentrações 10 vezes superiores às fisiológicas (253). Nestes casos, foram já descritos níveis plasmáticos de ADR e NA de 11 e 120 nM, respectivamente (74).

O aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas pode, igualmente, surgir como consequência da administração exógena destes compostos em determinadas situações patológicas, como é o caso da doença cardíaca severa (254). Num estudo efectuado por Raymonds *et al.* (2000), após administração de ADR, por via endovenosa ou por administração endotraqueal, a pacientes sujeitos a intervenções cirúrgicas devido a falha cardíaca grave, foi possível detectar picos plasmáticos de ADR de 20,2 e 57,9 nM, respectivamente (254).

Adicionalmente, fármacos que estimulam os receptores nicotínicos, os receptores da angiotensina II e os receptores do glucagão causam, igualmente, aumentos nos níveis plasmáticos de ADR (230). Por último, o aumento dos níveis de catecolaminas pode surgir como consequência do consumo de determinadas drogas de abuso, como é o caso das anfetaminas (194). De facto, muitos dos efeitos tóxicos atribuídos a esta classe de drogas são devidos ao aumento dramático da libertação de aminas biogénicas dos seus locais de armazenamentos nos terminais nervosos (255). Estudos *in vivo* com ratos aos quais foram administradas diferentes doses de *d*-anfetamina reportaram aumentos acentuados dos níveis plasmáticos de catecolaminas que, para o caso particular da ADR, atingiram concentrações de 146,13 nM após a administração da droga numa dose de 80 mg/kg (194).

Deste modo, os limites de detecção estabelecidos enquadram-se dentro dos níveis de ADR esperados a nível biológico em determinadas situações

patológicas ou de stress emocional, o que vai de encontro ao objectivo principal do desenvolvimento desta metodologia analítica.

4.5.5 Recuperações do Processo de Extracção

O último parâmetro avaliado no âmbito da validação da presente metodologia diz respeito à análise da eficácia de recuperação do processo de extracção pela alumina.

A recuperação de um analito, num determinado ensaio, corresponde à reposta do detector obtida a partir da quantidade de analito adicionada e extraída de uma matriz biológica, comparada com a resposta do detector face à verdadeira concentração presente no padrão (245). Os estudos de recuperação devem ser efectuados comparando os resultados analíticos de amostras extraídas com três concentrações diferentes (baixa, média e alta) com padrões não extraídos que representem 100% de recuperação (245).

Para o efeito, foram efectuadas misturas reaccionais em soro humano com diferentes concentrações finais de ADR (Soro + ADR 200, 4 e 0,8 μM + GSH 0,5 mM + TIR). Para cada concentração foram efectuadas 5 réplicas, sendo o volume final de cada réplica de 1500 μL . Deste modo, cada réplica foi directamente injectada (20 μL) no HPLC e parte (750 μL) submetida ao processo de extracção pela alumina. Após recuperação dos compostos adsorvidos na alumina pela adição de 2*150 μL de PCA a 5%, o volume foi completado a 750 μL com posterior injeção no HPLC (20 μL). Segundo este protocolo, 100% de recuperação corresponderá, para uma mesma concentração de ADR na mistura reaccional, a áreas idênticas dos picos cromatográficos dos aductos nas amostras extraídas e não extraídas. Deste modo, procedeu-se à análise dos cromatogramas obtidos por detecção electroquímica e à integração das áreas dos picos detectados. Para cada valor de concentração efectuou-se o cálculo do valor médio de área de cada pico, o qual se encontra ilustrado na [Tabela 4.35](#)~~Tabela 4.35~~.

Tabela 4.35 - Valores médios de área dos picos obtidos durante o estudo de avaliação da recuperação do processo de extração. Amostras extraídas: Soro + ADR 200 μM + GSH 0,5 mM + TIR; Soro + ADR 4 μM + GSH 0,5 mM + TIR e Soro + ADR 0,8 μM + GSH 0,5 mM + TIR.

Amostras não extraídas		
Concentração (μM)	Área do pico do 1º monoconjugado	Área do pico do 2º monoconjugado
200	4,94E+05 \pm 6,79E+03	2,58E+06 \pm 3,45E+04
4	1,45E+05 \pm 1,09E+04	8,20E+05 \pm 1,72E+04
0,8	2,84E+04 \pm 2,25E+03	2,00E+05 \pm 8,32E+03
Amostras extraídas		
Concentração (μM)	Área do pico do 1º monoconjugado	Área do pico do 2º monoconjugado
200	3,53E+05 \pm 9,95E+03	1,37E+06 \pm 6,14E+04
4	1,25E+05 \pm 2,40E+03	4,73E+05 \pm 1,18E+04
0,8	2,67E+04 \pm 2,08E+03	1,02E+05 \pm 4,45E+03

Com base nesses valores efectuou-se, para cada concentração e para cada pico, a comparação das áreas das amostras extraídas com as amostras não extraídas, obtendo-se as respectivas percentagens de recuperação ilustradas na

[Tabela 4.36](#) ~~Tabela 4.36~~.

Tabela 4.36 - Valores médios de eficácia de extracção dos dois monoconjugados da adrenalina com a GSH estabelecidos para diferentes valores de concentração de adrenalina na mistura reaccional (Soro + ADR $X \mu\text{M}$ + GSH 0,5 mM + TIR, em que X pode ser 200, 4 ou 0,8 μM).

Concentração de Adrenalina (μM) na Mistura reaccional (Soro + ADR $X \mu\text{M}$ + GSH 0,5 mM + TIR)	1º Monoconjugado (%)	2º Monoconjugado (%)
200	71,39 \pm 1,21	53,08 \pm 1,93
4	88,52 \pm 5,39	57,98 \pm 1,23
0.8	93,79 \pm 1,26	51,11 \pm 0,36

Tal como se pode observar pela análise da referida tabela não existe um padrão homogéneo de eficácia de extracção, sendo que esta varia com o composto extraído e, no caso do 1º monoconjugado, com a concentração do mesmo. Contudo, existem dois aspectos importantes a salientar. O primeiro relaciona-se com o facto de, apesar da eficácia da extracção ser inferior para o 2º monoconjugado, a quantidade deste composto presente na mistura reaccional é bastante superior à do 1º monoconjugado, minimizando assim o problema. O segundo aspecto a salientar diz respeito ao facto de, apesar de em determinadas situações, a eficácia da extracção ser de sensivelmente 50%, ocorre sempre uma concentração da amostra extraída. Tal deve-se ao facto de o volume de solvente extractor (300 μL) ser inferior ao volume de amostra extraída (750 μL).

A recuperação de um analito não necessita de ser 100%, mas a extensão da recuperação de um analito deve ser consistente, precisa e reprodutível (245). Deste modo, apesar de se verificar que as recuperações dos aductos variam com a concentração de ADR e com o composto extraído, para cada valor de concentração e para cada monoconjugado extraído, verifica-se a reprodutibilidade dos resultados, dado o baixo desvio padrão obtido a partir das áreas das cinco réplicas testadas.

CONCLUSÕES GERAIS

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos efectuados no âmbito da optimização e validação da metodologia por HPLC-ED permitiram:

- A.** Desenvolvimento de uma metodologia para a síntese de aductos das catecolaminas com a GSH por catálise enzimática e respectiva detecção por HPLC-ED. Deste modo, procedeu-se:
 - 1. À síntese dos aductos numa reacção catalisada pela enzima tirosinase, na presença de cada catecolamina e GSH.
 - 2. Ao estabelecimento de uma metodologia por HPLC, em fase reversa, com eluição isocrática a 1 mL/min de fase móvel constituída por metanol, ácido cítrico (50 mM) e ácido octanossulfónico (0.46 mM) com pH ajustado a 3.0.
 - 3. À definição dos potenciais adequados a aplicar ao detector electroquímico (guard cell: +500 mV; E₁: -75 mV; E₂: +450 mV)
- B.** Caracterização dos aductos das catecolaminas biogénicas com a GSH por espectrometria de UV/Vis e espectrometria de massa.
- C.** Desenvolvimento de uma metodologia que permite a análise directa de aductos de catecolaminas com a GSH, em soro humano, possibilitando o estudo do processo de oxidação das catecolaminas. A metodologia estabelecida encontra-se esquematizada na Figura 5.1 e comporta os seguinte passos:
 - 1. Acidificação imediata da amostra com PCA (concentração final de 5%), dada a comprovada estabilidade dos aductos a pH ácido;
 - 2. Centrifugação, recolha do sobrenadante e conservação a -80 °C até à sua extracção (a pH ácido e a esta temperatura é possível evitar a degradação dos aductos);
 - 3. Extracção rápida da amostra:
 - i. Agitação da amostra com a alumina na presença de um tampão de extracção composto por Tris/EDTA (1.5 M/15 mM) a pH 8,6 durante 15 minutos. Dado o importante papel do ácido ascórbico na prevenção da formação

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold

espontânea de aductos durante esta etapa de agitação, recomenda-se a sua utilização no tampão de extracção numa concentração de 5 mM.

- ii. Remoção do tampão de extracção e lavagem da alumina com água destilada fria;
 - iii. Remoção dos compostos adsorvidos na alumina pela adição de 300 µL de PCA a 5% (2*150 µL). A extracção fraccionada com a adição de 2*150 µL de PCA a 5% permite aumentar o rendimento extractivo, embora não permita retirar a totalidade dos aductos adsorvidos na alumina.
4. Injecção da amostra no sistema de HPLC-ED (caso a amostra não seja analisada por HPLC-ED imediatamente após a sua extracção deverá ser armazenada a -80 °C, sendo que a referida análise deverá ser efectuada tão brevemente quanto possível).
- D. Avaliação da metodologia desenvolvida e optimizada para os monoconjugados da ADR com a GSH, sendo de realçar os seguintes parâmetros avaliados:**
1. Excelente precisão no que respeita à repetibilidade instrumental (CV <3%), repetibilidade do procedimento experimental global (CV <5%) e precisão intermédia (CV <6%);
 2. Resposta linear na gama de concentrações de 0 a 0,175 mM, obtida mediante análise de cinco concentrações diferentes;
 3. O processo de extracção permitiu o estabelecimento de limites de detecção que se enquadram dentro dos valores esperados para as catecolaminas em determinadas condições patofisiológicas (2 pmol e 0.066 pmol de adrenalina para o primeiro e segundo monoconjugados, respectivamente);
 4. Recuperações do processo de extracção diferentes para os monoconjugados da ADR (entre 53 e 93%, dependendo do aducto e da concentração testada).

A metodologia desenvolvida permite uma análise directa de aductos de catecolaminas com a GSH em soro humano (podendo também ser aplicada a outras matrizes biológicas), possibilitando o estudo do processo de oxidação das catecolaminas, bem como a avaliação da toxicidade associada a estes compostos, nomeadamente a cardiotoxicidade, neurotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Estes compostos podem formar-se em consequência de situações patológicas que são acompanhadas do aumento dos níveis de catecolaminas biogénicas (como por exemplo, feocromocitoma, hipoglicémia, hipotensão hemorrágica, asfixia, colapso circulatório e stress emocional) ou, então, resultar da administração de determinados fármacos ou drogas (como por exemplo, as anfetaminas).

A metodologia de HPLC-ED desenvolvida foi validada para a detecção de aductos da adrenalina com a GSH em soro humano, utilizando o processo de extracção dos aductos baseado na sua adsorção na alumina. Este método de extracção é importante uma vez que remove interferências da matriz, permitindo obter um baixo volume de extracto purificado adequado à sua injeção no sistema de HPLC. Apesar das recuperações relativamente baixas do segundo aducto, o limite de detecção enquadra-se dentro das concentrações plasmáticas de adrenalina esperadas em determinadas situações patofisiológicas e/ou farmacoterapia. Os resultados obtidos sugerem igualmente que para aplicação da presente metodologia a amostras clínicas é extremamente importante acidificar imediatamente as amostras e usar ácido ascórbico 5 mM para prevenir a formação espontânea destes compostos.

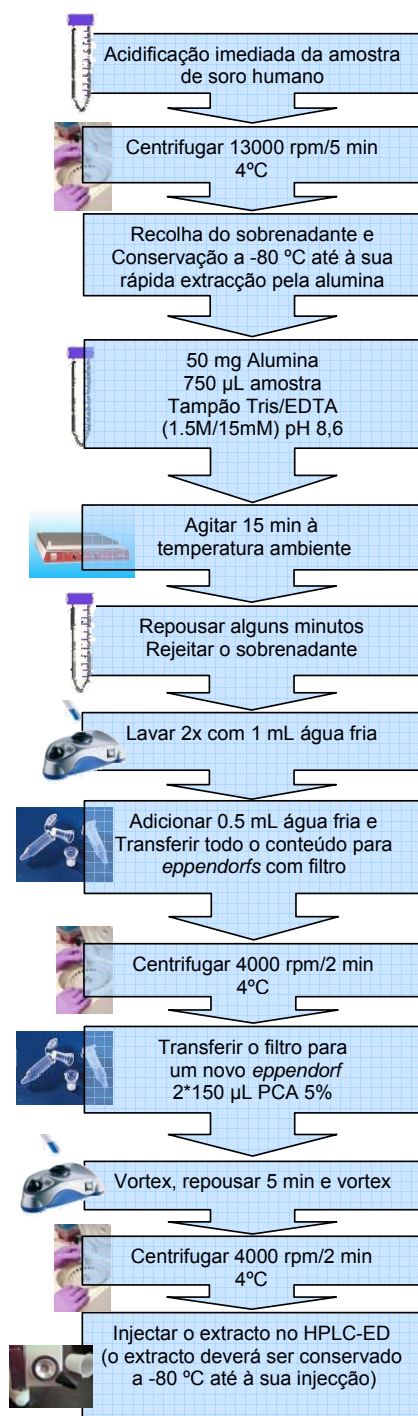


Figura 5.1 - Protocolo experimental proposto para o processamento das amostras de soro humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Oliver, G. and Schäfer, E. A. (1895) The physiological action of extract of the suprarenal capsules. *Journal of Physiology (London)* 18, 230-276.
- (2) Hoffman, B. B. (2001) Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists, In *Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics*. (Hardman, J. G., Limbird, L. E. and Gilman, A. G., Eds.) pp 215-268, McGraw-Hill, New York.
- (3) Lewandowsky, M. (1898) Ueber eine wirkung des nebennieren-extractes auf das auge. *Zentralblatt fur Physiology* 12, 599-600.
- (4) Langley, J. N. (1901) Observations on the physiological action of extracts of the supra-renal bodies. *Journal of Physiology (London)* 27, 237-256.
- (5) Hoffman, B. B. and Taylor, P. (2001) Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems, In *Goodman & Gilman's: the Pharmacological Basis of Therapeutics*. (Hardman, J. G., Limbird, L. E. and Gilman, A. G., Eds.) pp 115-153, McGraw-Hill, New York.
- (6) Barger, G. and Dale, H. H. (1910) Chemical structure and sympathomimetic action of amines. *Journal of Physiology (London)* 41, 19-59.
- (7) Cannon, W. B. and Uridil, J. E. (1921) Studies on conditions of activity in endocrine glands. VIII. Some effects on the denervated heart of stimulating the nerves of the liver. *American Journal of Physiology* 58, 353-354.
- (8) Lullmann, H., Mohr, K., Ziegler, A. and Bieger, D. (2000) *Color Atlas of Pharmacology*, 2 ed, pp 79-94, Thieme, Stuttgart.
- (9) Ruffolo, R. R. (1994) Peripheral Autonomic Nervous System: drugs affecting transmission and function, In *Human Pharmacology - molecular to clinical* (Brody, T. M., Larner, J., Minneman, K. P. and Neu, H. C., Eds.) pp 81-156, Mosby-year Book, inc, Missouri.
- (10) Kuhar, M. J., Couceyro, P. R. and Lambert, P. D. (1999) Catecholamines, In *Basic Neurochemistry - Molecular, Cellular and Medical Aspects* (Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K. and Uhler, M. D., Eds.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

- (11) Christenson, J. G., Dairman, W. and Udenfriend, S. (1970) Preparation and properties of homogeneous aromatic l-amino acid decarboxylase from hog kidney *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 141, 356-367.
- (12) Craine, J. E., Daniels, G. and Kaufman, S. (1973) Dopamine b-hydroxylase: The subunit structure and anion activation of the bovine adrenal enzyme. *Journal of biological chemistry*, 248, 7838-7844.
- (13) Connett, R. J. and Kirshner., N. (1970) Purification and properties of bovine phenylethanolamine-N-methyltransferase. *Journal of biological chemistry* 245 (2), 329-334.
- (14) Weinshilboum, R. M., Thoa, N. B., Johnson, D. G., Kopin, I. J. and Axelrod, J. (1971) Proportional release of norepinephrine and dopamine b-hydroxylase from sympathetic nerves. *Science* 174, 1349-1351.
- (15) Alousi, A. and Weiner, N. (1966) The regulation of norepinephrine synthesis in sympathetic nerves: Effect of nerve stimulation, cocaine and catecholamine-releasing agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 56, 1491-1496.
- (16) Goldstein, M. (1995) Long- and short-term regulation of tyrosine hydroxylase, In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress* (Bloom, F. E. and Kupfer, D. J., Eds.) pp 189 -196, Raven Press, New York.
- (17) Zigmond, R. E., Schwarzschild, M. A. and Rittenhouse, A. R. (1989) Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annual review of neuroscience* 12, 415-461.
- (18) Langer, S. Z. (1997) 25 Years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. *Trends in pharmacological sciences* 18, 95-99.
- (19) Goldstein, D. S. (1995) *Stress, Catecholamines and Cardiovascular Disease*, 1 ed., Oxford University Press, Oxford.
- (20) Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M. and Caron, M. G. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews* 78, 189-225.

-
- (21) Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C. and Caron, M. G. (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35, 1503-1519.
- (22) Keibadian, J. W., Petzold, G. L. and Greengard, P. (1972) Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain and its similarity to the "dopamine receptor". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69, 2145-2149.
- (23) Spano, P. F., Govoni, S. and Trabucchi, M. (1978) Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Advances in biochemical psychopharmacology* 19, 155-165.
- (24) Keibadian, J. W. and Calne, D. B. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93-96.
- (25) Giannattasio, G., Ferrari, M. E. D. and Spada, A. (1981) Dopamine-inhibited adenylate cyclase in female rat adenohypophysis. *Life sciences* 28, 1605-1612.
- (26) Onali, P., Schwartz, J. P. and Costa, E. (1983) Inhibition of VIP sensitive adenylate cyclase by dopamine in rat anterior pituitary. *Advances in biochemical psychopharmacology* 36, 199-207.
- (27) Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M. P., Barthenet, M. L. and Schwartz, J. C. (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D-3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347, 146-151.
- (28) Vantol, H. H. M., Bunzow, J. R., Unzow, H., Guan, C., Sunahara, R. K., Seeman, P., Niznik, H. B. and Civelli, O. (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350, 610-614.
- (29) Sunahara, R. K., Guan, H.-C., O'Dowd, B. F., Seeman, P., Laurier, L. G., NG, G., George, S. R., Torchia, J. and Vantol, H. H. M. (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350, 614-619.
- (30) Tiberi, M., Jarvie, K. R., Silvia, C., Falardeau, P., GIN-Grich, J. A., Godinot, N., Bertrand, L., Yang-Feng, T. L., Freneau, R. T. and Caron, M. G. (1991) Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a

- gene encoding a second D1dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1a receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7491-7495.
- (31) Sokoloff, P. and Schwartz, J. C. (1995) Novel dopamine receptors half a decade later. *Trends in pharmacological sciences* 16, 270–275.
 - (32) Seeman, P. and VanTol, H. H. M. (1994) Dopamine receptor pharmacology. *Trends in pharmacological sciences* 15, 264–270.
 - (33) Jackson, D. M. and Westlind-Danielsson, A. (1994) Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacology & therapeutics* 64, 291–369.
 - (34) Gingrich, J. A. and Caron, M. G. (1993) Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annual review of neuroscience* 16, 299-321.
 - (35) Eisenhofer, G., Kopin, I. J. and Goldstein, D. S. (2004) Catecholamine Metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological Reviews* 56, 331-349.
 - (36) Nikodejevic, B., Sinoh, S., Daly, J. W. and Creveling, C. R. (1970) Catechol-O-methyltransferase II: A new class of inhibitors of catechol-O-methyltransferase; 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzoic acid and related compounds *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 74, 83-93.
 - (37) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3 ed. (Wallace, K. B, Eds.), Oxford University Press, New York.
 - (38) Sies, H. (1991) Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *American Journal of Medicine* 91, 31S-38S.
 - (39) Koppenol, W. H. (1997) The Chemical Reactivity of Radicals, In *Free Radical Toxicology* (Wallace, K. B., Ed.) pp 3-14, Taylors & Francis, Washington.
 - (40) Bast, A., Haenen, G. R. M. M. and Doelman, C. J. A. (1991) Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American Journal of Medicine* 91 (Suppl 3C), 2S-13S.

-
- (41) Gille, G. and Sigler, K. (1995) Oxidative Stress and Living Cells. *Folia Microbiologica* 40, 131-152.
- (42) Cadet, J. L. and Brannock, C. (1998) Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry international* 32, 117-131.
- (43) Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (2001b) Copper enhances isoproterenol toxicity in isolated rat cardiomyocytes: effects on oxidative stress. *Cardiovascular Toxicology* 1, 195-204.
- (44) Remião, F., Carvalho, M., Carmo, H., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (2002) Cu²⁺-Induced Isoproterenol Oxidation into Isoprenochrome in Adult Rat Calcium-Tolerant Cardiomyocytes. *Chemical research in toxicology* 15, 861-869.
- (45) Benedetti, M. S. and Dostert, P. (1994) Contribution of amine oxidases to the metabolism of xenobiotics. *Drug metabolism reviews* 26, 507-535.
- (46) Dhalla, N. S., Sasaki, H., Mochizuki, S., Dhalla, K. S., Liu, X. and Elimban, V. (2001) Catecholamine-induced cardiomyopathy, In *Cardiovascular Toxicity* (Acosta, D., Ed.) pp 269-318, Raven Press, New York.
- (47) Carvalho, F. D., Duarte, J. A., Carmo, H., Neuparth, M. J., Fernandes, E., Remião, F. and Bastos, M. L. (2001) Hydrogen peroxide production in mouse tissues after acute d-amphetamine administration. Influence of monoamine oxidase inhibition. *Archives of Toxicology* 75, 465-469.
- (48) Duarte, J. A., Carvalho, F., Fernandes, E., Remiao, F., Bastos, M. L., Magalhães, J. and Appell, H. J. (2004) d-amphetamine-induced hydrogen peroxide production in skeletal muscle is modulated by monoamine oxidase inhibition. *International Journal of Sports Medicine* 25, 446-449.
- (49) Behonick, G. S., Novak, M. J., Nealley, E. W. and Baskin, S. I. (2001) Toxicology Update: the Cardiotoxicity of the Oxidative Stress Metabolites of Catecholamines (Aminochromes). *Journal of Applied Toxicology* 21, S15-S22.
- (50) Bindoli, A., Rigobello, M. P. and Deeble, D. J. (1992) Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free radical biology & medicine* 13, 391-405.

- (51) Bindoli, A., Rigobello, M. P. and Galzigna, L. (1989) Toxicity of aminochromes. *Toxicology Letters* 48, 3-20.
- (52) Tse, D. C., McCreery, R. L. and Adams, R. N. (1976) Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *Journal of medicinal chemistry* 19, 37-40.
- (53) Hastings, T. G., Lewis, D. A. and Zigmond, M. J. (1996) Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1956-1961.
- (54) Dooley, T. P. (1998) Cloning of the human phenol sulfotransferase gene family: three genes implicated in the metabolism of catecholamines, thyroid hormones and drugs. *Chemico-Biological Interactions* 109, 29-41.
- (55) Raper, H. S. (1928) The aerobic oxidases. *Physiological Reviews* 8, 245-282.
- (56) Rupp, H., Dhalla, K. S. and Dhalla, N. S. (1994) Mechanisms of cardiac cell damage due to catecholamines: significance of drugs regulating central sympathetic outflow. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 24 S16-24.
- (57) Chavdarian, C. G., Karashima, D. and Castagnoli, N. (1978) Oxidative and cardiovascular studies on natural and synthetic catecholamines. *Journal of Medicinal Chemistry* 21, 548-554.
- (58) Hawley, M. D., Tatawawadi, S. V., Piekarski, S. and Adams, R. N. (1967) Electrochemical studies of the oxidation pathways of catecholamines. *Journal of American Chemical Society* 89, 447-450.
- (59) Schweigert, N., Zehnder, A. J. B. and Eggen, R. I. L. (2001) Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiology* 3, 81-91.
- (60) Foppoli, C., Coccia, R., Cini, C. and Rosei, M. (1997) Catecholamines oxidation by xanthine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1334, 200-206.
- (61) Rosei, M. A., Blarzino, C., Foppoli, C., Mosca, L. and Coccia, R. (1994) Lipoxygenase-catalyzed oxidation of catecholamines. *Biochemical and biophysical research communications* 200, 344-350.

-
- (62) Heacock, R. A. (1959) The chemistry of adrenochromes and related compounds. *Chemical Review* 59, 226-237.
- (63) Matthews, S. B., Henderson, A. H. and Campbell, A. K. (1985) The adrenochrome pathway: the major route for adrenalin catabolism by polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 17, 339-448.
- (64) Choi, D.-K., Pennathur, S., Perier, C., Tieu, K., Teismann, P., Wu, D.-C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Vonsattel, J.-P., Heinecke, J. W. and Przedborski, S. (2005) Ablation of the Inflammatory Enzyme Myeloperoxidase Mitigates Features of Parkinson's Disease in Mice. *The Journal of Neuroscience* 25, 6594-6600.
- (65) Genova, M. L., Abd-El Salam, N. M., Mahdy, E. S. M. E., Bernacchia, A., Lucarini, M., Pedulli, G. F. and Lenaz, G. (2006) Redox cycling of adrenaline and adrenochrome catalysed by mitochondrial Complex I. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- (66) Giulivi, C. and Cadenas, E. (1998) Oxidation of adrenaline by ferrylmyoglobin. *Free Radical Biology and Medicine* 25, 175-183.
- (67) Rigobello, M. P., Scutari, G., Boscolo, R. and Bindoli, A. (2001) Oxidation of adrenaline and its derivatives by S-nitrosoglutathione. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 5, 39-46.
- (68) Cha, M.-K. and Kim, I.-H. (1999) Ceruloplasmin has a distinct active site for the catalyzing glutathione-dependent reduction of alkyl hydroperoxide. *Biochemistry* 38, 12104-12110.
- (69) Macarthur, H., Westfall, T. C., Riley, D. P., Misko, T. P. and Salvemini, D. (2000) Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9753-9758.
- (70) Klatt, P., Cacho, J., Crespo, M. D., Herrera, E. and Ramos, P. (2000) Nitric oxide inhibits isoproterenol-stimulated adipocyte lipolysis through oxidative inactivation of the beta-agonist. *Biochemical Journal* 351, 485-493.

- (71) Palumbo, A., d'Ischia, M., Misuraca, G. and Protà, G. (1989) A new look at the rearrangement of adrenochrome under biomimetic conditions. *Biochimica et biophysica acta* 990, 297-302.
- (72) d'Ischia, M., Palumbo, A. and Protà, G. (1988) Adrenalin oxidation revisited. New products beyond the adrenochrome stage. *Tetrahedron* 44, 6441-6446.
- (73) Pattison, D. I., Dean, R. T. and Davies, M. J. (2002) Oxidation of DNA, proteins and lipids by DOPA, protein-bound DOPA, and related catechol(amine)s. *Toxicology* 177, 23-37.
- (74) Hegedus, Z. L. (2000) The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side-products in human diseases and aging. *Toxicology* 145, 85-101.
- (75) Baez, S. and Segura-Aguilar, J. (1994) Formation of reactive oxygen species during one-electron reduction of noradrenochrome catalyzed by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Redox Report* 1, 65-70.
- (76) Segura-Aguilar, J., Metodiewa, D. and Welch, C. J. (1998) Metabolic activation of dopamine o-semiquinones by NADPH cytochrome P450 reductase may play an important role in oxidative stress and apoptotic effects. *Biochimica et Biophysica Acta* 1381, 1-6.
- (77) Arriagada, C., Dagnino-Subiabre, A., Ceviedes, P., Armero, J. M., Caviedes, R. and Segura-Aguilar, J. (2000) Studies of aminochrome toxicity in a mouse derived neuronal cell line: is this toxicity mediated via glutamate transmission? *Amino Acids* 18, 363-373.
- (78) Bindoli, A., Rigobello, M. P. and Galzigna, L. (1990b) Reduction of adrenochrome by rat liver and brain DT-diaphorase. *Free Radical and Research Communications* 8, 295-298.
- (79) Segura-Aguilar, J. and Lind, C. (1989) On the mechanism of the Mn^{3+} -induced neurotoxicity of dopamine: prevention of quinone-derived oxygen toxicity by DT-diaphorase and superoxide dismutase. *Chemico-Biological Interactions* 72, 309-324.
- (80) d'Ischia, M., Palumbo, A. and Protà, G. (1988) Adrenalin oxidation revisited. New products beyond the adrenochrome stage. *Tetrahedron* 44, 6441-6446.

-
- (81) Palumbo, A., d'Ischia, M., Misuraca, G. and Protta, G. (1989) A new look at the rearrangement of adrenochrome under biomimetic conditions. *Biochimica et biophysica acta* 990, 297-302.
- (82) Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G. and Monks, T. J. (2000) Role of Quinones in Toxicology. *Chemical research in toxicology* 13, 135-160.
- (83) Terland, O., Flatmark, T., Tangeras, A. and Gronberg, M. (1997) Dopamine oxidation generates an oxidative stress mediated by dopamine semiquinone and unrelated to reactive oxygen species. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29, 1731-1738.
- (84) Monks, T. J. and Lau, S. S. (1992) Toxicology of quinone-thioethers. *Critical Reviews in Toxicology* 22, 243-270.
- (85) Dhalla, K. S., Rupp, H., Beamish, R. E. and Dhalla, N. S. (1996) Mechanisms of alterations in cardiac membrane Ca^{2+} transport due to excess catecholamines. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 10, 231-238.
- (86) Sies, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical in Biology and Medicine* 27, 916-921.
- (87) Griffith, O. W. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 922-935.
- (88) Schafer, F. Q. and Buettner, G. R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 1191-1212.
- (89) Kretzschmar, M. and Klinger, W. (1990) The hepatic glutathione system - influences of xenobiotics. *Experimental Pathology* 38, 145-164.
- (90) Monks, T. J. and Lau, S. S. (1997) Biological Reactivity of Polyphenolic-Glutathione Conjugates. *Chem Res Toxicol* 10 1296-1313.
- (91) Monks, T. J. and Lau, S. S. (1998) The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38, 229-255.
- (92) Nyyssönen, K. and Parviainen, M. T. (1989) Plasma catecholamines: laboratory aspects. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 27, 211-236.

- (93) Dhalla, N. S., Yates, J. C., Naimark, B., Dhalla, K. S., Beamish, R. E. and Ostadal, B. (1992) Cardiotoxicity of catecholamines and related agents, In *Cardiovascular Toxicity* (Acosta, D., Ed.) pp 239-281, Raven Press, New York.
- (94) Nikolaidis, L. A., Hentosz, T., Doverspike, A., Huerbin, R., Stolarski, C., Shen, Y.-T. and Shannona, R. P. (2002) Catecholamine stimulation is associated with impaired myocardial O₂ utilization in heart failure. *Cardiovascular Research* 53, 392-404.
- (95) Webber, J. and Macdonald, I. A. (2000) Signalling in body-weight homeostasis: neuroendocrine efferent signals. *The Proceedings of the Nutrition Society* 59, 397-404.
- (96) Grynberg, A., Ziegler, D. and Rupp, H. (1996) Sympathoadrenergic overactivity and lipid metabolism. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 10, 223-230.
- (97) Mohan, P. and Bloom, S. (1999) Lipolysis is an important determinant of isoproterenol-induced myocardial necrosis. *Cardiovascular Pathology* 8, 255-261.
- (98) Tappia, P. S., Hata, T., Hozaima, L., Sandhu, M. S., Panagia, V. and Dhalla, N. S. (2001) Role of Oxidative Stress in Catecholamine-Induced Changes in Cardiac Sarcolemmal Ca²⁺ Transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 387, 85-92.
- (99) Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G. and Nicotera, P. (1989) Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends in pharmacological sciences* 10, 281-285.
- (100) Pinellia, A., Trivulzio, S., Tomasoni, L., Bertolini, B., Brenna, S., Bonacina, E. and Vignati, S. (2004) Myocardial infarction non-invasively induced in rabbits by administering isoproterenol and vasopressin: protective effects exerted by verapamil. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 18, 657-667.
- (101) Beamish, R. E., Dhillon, K. S., Singal, P. K. and Dhalla, N. S. (1981) Protective effect of sulfinpyrazone against catecholamine metabolite adrenochrome-induced arrhythmias. *American Heart Journal* 102, 149-152.
- (102) Singal, P. K., Dhillon, K. S., Beamish, R. E., Kapur, N. and Dhalla, N. S. (1982) Myocardial cell damage and cardiovascular changes due to I.V.

- infusion of adrenochrome in rats. *British Journal of Experimental Pathology* 63, 167-176.
- (103) Taam, G. M., Takeo, S., Ziegelhoffer, A., Singal, P. K., Beamish, R. E. and Dhalla, N. S. (1986) Effect of adrenochrome on adenine nucleotides and mitochondrial oxidative phosphorylation in rat heart. *Canadian Journal of Cardiology* 2, 88-93.
- (104) Yates, J. C., Beamish, R. E. and Dhalla, N. S. (1981) Ventricular dysfunction and necrosis produced by adrenochrome metabolite of epinephrine: relation to pathogenesis of catecholamine cardiomyopathy. *American Heart Journal* 102, 210-221.
- (105) Takeo, S., Taam, G. M. L., Beamish, R. E. and Dhalla, N. S. (1981) Effects of adrenochrome on calcium accumulation by heart mitochondria. *Biochemical Pharmacology* 30, 157-163.
- (106) Yates, J. C., Taam, G. M. L., Singal, P. K., Beamish, R. E. and Dhalla, N. S. (1980) Protection against adrenochrome-induced myocardial damage by various pharmacological interventions. *British Journal of Experimental Pathology* 61, 242-255.
- (107) Remião, F., Rettori, D., Han, D., Carvalho, F., Bastos, M. L. and Cadenas, E. (2004) Leucoisoprenochrome-o-semiquinone formation in freshly isolated adult rat cardiomyocytes. *Chemical Research in Toxicology* 17, 1584-1590.
- (108) Takeo, S., Taam, G. M. L., Beamish, R. E. and Dhalla, N. S. (1980b) Effects of adrenochrome on calcium accumulation and adenosine triphosphatase activities of the rat heart microsomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 214, 688-693.
- (109) Takeo, S., Fliegel, L., Beamish, R. E. and Dhalla, N. S. (1980a) Effects of adrenochrome on rat heart sarcolemmal ATPase activities. *Biochemical Pharmacology* 29, 559-564.
- (110) Dhalla, N. S., Yates, J. C., Lee, S. L. and Sinh, A. (1978) Functional and subcellular changes in the isolated rat heart perfused with oxidized isoproterenol. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 10, 31-41.

- (111) Remião, F., Ferreira, H., Ramos, G., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (1999) Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *Toxicology Letters* 95 (Suppl 1), 95.
- (112) Brunmark, A. and Cadenas, E. (1989) Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free radical biology & medicine* 7, 435-777.
- (113) Bindoli, A., Deeble, D. J., Rigobello, M. P. and Galzigna, L. (1990a) Direct and respiratory chain-mediated redox cycling of adrenochrome. *Biochimica et Biophysica Acta* 1016, 349-356.
- (114) Paris, I., Dagnino-Subiabre, A., Marcelain, K., Bennett, L. B., Caviades, P., Caviades, R., Azar, C. O. and Segura-Aguilar, J. (2001) Copper neurotoxicity is dependent on dopamine-mediated copper uptake and one-electron reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. *Journal of Neurochemistry* 77, 519-529.
- (115) Singal, P. K., Kapur, N., Dhillon, K. S., Beamish, R. E. and Dhalla, N. S. (1981) Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 60, 1390-1397.
- (116) Spencer, J. P. E., Jenner, P., Daniel, S. E., Lees, A. J., Marsden, D. C. and Halliwell, B. (1998) Conjugates of Catecholamines with Cysteine and GSH in Parkinson' s Disease: Possible Mechanisms of Formation Involving Reactive Oxygen Species. *Journal at Neurochemistry* 71, 2112-2122
- (117) Spencer, J. P. E., Whiteman, M., Jenner, P. and Halliwell , B. (2002) 5-S-Cysteinyln-conjugates of catecholamines induce cell damage, extensive DNA base modification and increases in caspase-3 activity in neurons. *Journal of Neurochemistry* 81, 122-129.
- (118) Graham, D. G. (1984) Catecholamine toxicity : a proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease *Neurotoxicology* 5, 83-96.
- (119) Cohen, G. (1985) Oxidative stress in the nervous system, In *Oxidative Stress* (Sies, H., Ed.) pp 383-401, Academic Press, London.
- (120) Halliwell, B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of neurochemistry* 59, 1609-1623

- (121) Mytilineou, C., Han, S.-K. and Cohen, G. (1993) Toxic and protective effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures . *Journal of neurochemistry* 61, 1470-1478.
- (122) Tanaka, M., Sotomatsu, A., Kanai, H. and Hirai, S. (1991) Dopa and dopamine cause cultured neuronal death in the presence of iron . *Journal of the neurological sciences* 101, 198-203
- (123) Filloux, F. and Townsend, J. J. (1993) Pre- and postsynaptic neurotoxic effects of dopamine demonstrated by intrastriatal injection . *Experimental neurology* 119, 79-88.
- (124) Townsend, D. M., Tew, K. D. and Tapiero, H. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57, 145-155.
- (125) Carlsson, A. and Winblad, B. (1976) Influence of age and time interval between death and autopsy on dopamine and 3-methoxytyramine levels in human basal ganglia. *Journal of neural transmission* 38, 271-301.
- (126) Fornstedt, B. (1990) Role of catechol autoxidation in the degeneration of dopamine neurons. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum* 129, 12-14.
- (127) Chiueh, C. C., Miyake, H. and Peng, M. T. (1993) Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical generation and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced parkinsonism, In *Advances in Neurology: Parkinson's Disease* (Narabayashi, H., Nagatsu, T. and Yanagisawa, N., Eds.) pp 251-258, Raven Press, New York.
- (128) Jenner, P., Dexter, D. T., Sian, J., Schapira, A. H. and Marsden, C. D. (1992) Oxidative stress as a cause of nigral cells death in Parkinson's disease and incidental Lewy body Disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's disease research group. *Annals of neurology* 32, S82-87.
- (129) Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W. D., Schmidt, B., Reynolds, G. P., Jellinger, K. and Youdim, M. B. (1989) Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *Journal of neurochemistry* 52, 515-520.

- (130) Cohen, G. (1983) The pathobiology of Parkinson's disease: biochemical aspects of dopamine neuron senescence. *Journal of neural transmission. Supplementum* 19, 89-103.
- (131) Perry, T. L., Godin, D. V. and Hansen, S. (1982) Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency. *Neuroscience letters* 33, 305-310.
- (132) Kish, S. J., Morito, C. and Hornykiewicz, O. (1985) Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neuroscience letters* 58, 343-346.
- (133) Spencer, J. P., Jenner, P. and Halliwell, B. (1995) Superoxide-dependent depletion of reduced glutathione by L-DOPA and dopamine. Relevance to Parkinson's disease. *Neuroreport* 6, 1480-1484.
- (134) Dexter, D. T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F. R., Daniel, S. E., Lees, A. J., Jenner, P. and Marsden, C. D. (1991) Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 114, 1953-1975.
- (135) Dexter, D. T., Jenner, P., Schapira, A. H. V. and Marsden, C. D. (1992) Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Annals of neurology* 32, S94-S100.
- (136) Cohen, G. (1986) Monoamine oxidase, hydrogen peroxide and Parkinson's disease. *Advances in neurology* 45, 119-125.
- (137) Jenner, P. (1994) Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* 344, 796-798.
- (138) Carstam, R., Brinck, C., Hindemith-Augustsson, A., Rorsman, H. and Rosengren, E. (1991) The neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochimica et biophysica acta*, 152-160.
- (139) Odb, G., Carstam, R., Paulson, J., Wittbjer, A., Rosengren, E. and Rorsman, H. (1994) Neuromelanin of the human substantia nigra: a mixed-type melanin. *Journal of neurochemistry* 62, 2030-2036.

- (140) Zhang, F. and G.Dryhurst. (1995a) Influence of glutathione on the oxidation chemistry of the catecholaminergic neurotransmitter dopamine. *Journal of electroanalytical chemistry*, 398, 117-128.
- (141) Zhang, F. and Dryhurst, G. (1995b) Reactions of cysteine and cysteinyl derivatives with dopamine-o-quinone and further insights into the oxidation chemistry of 5-S-cysteinyl dopamine: potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. *Bioorganic chemistry*, 23, 193-216.
- (142) Rosengren, E., Linder-Eliasson, F. and Carlsson, A. (1985) Detection of 5-S-cysteinyl dopamine in human brain. *Journal of neural transmission* 63, 247-253.
- (143) Fornstedt, B., Rosengren, E. and Carlsson, A. (1986) Occurrence and distribution of 5-S-cysteinyl derivatives of dopamine, dopa and dopac in the brains of eight mammalian species. *Neuropharmacology* 25, 451-454.
- (144) Fornstedt, B., Brun, A., Rosengren, F. and Carlsson, A. (1989) The apparent autooxidation rate of catechols in dopamine-rich regions of human brains increases with the degree of depigmentation of substantia nigra. *Journal of neural transmission* ,1, 279-295.
- (145) Shen, X. M., Zhang, F. and Dryhurst, G. (1997) Oxidation of dopamine in the presence of cysteine: characterisation of new toxic products. *Chemical research in toxicology* 10, 147-155.
- (146) Zhang, F. and Dryhurst, G. (1995a) Influence of glutathione on the oxidation chemistry of the catecholaminergic neurotransmitter dopamine. *Journal of electroanalytical chemistry* 398, 117-128.
- (147) Zhang, F. and Dryhurst, G. (1995b) Reactions of cysteine and cysteinyl derivatives with dopamine-o-quinone and further insights into the oxidation chemistry of 5-S-cysteinyl dopamine: potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. *Bioorganic chemistry* 23, 193-216.
- (148) Zhang, F. and Dryhurst, G. (1994) Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: new reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. *Journal of medicinal chemistry* 37, 1084-1098.

- (149) Shen, X. M. and Dryhurst, G. (1996) Further insights into the influence of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: reaction pathways of potential relevance to Parkinson's disease. *Chemical research in toxicology* 9, 751-763.
- (150) Li, H. and Dryhurst, G. (1997) Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHTB-1): a putative nigral endotoxine of relevance to Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 69, 1530-1541.
- (151) Hastings, T. G. and Zigmond, M. J. (1994) Identification of Catechol-Protein Conjugates in Neostriatal Slices Incubated with [3H]Dopamine: Impact of Ascorbic Acid and Glutathione. *Journal of neurochemistry* 63, 1126-1132.
- (152) Hewitt, K. E. and Green, A. R. (1994) Chlormethiazole, dizocilpine and haloperidol prevent the degeneration of serotonergic nerve terminals induced by administration of MDMA ('ecstasy') to rats. *Neuropharmacology* 33, 1589-1595.
- (153) Ricaurte, G. A., Yuan, J. and McCann, U. D. (200b) (\pm) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy")-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals. *Neuropsychobiology* 42, 5-10.
- (154) Sprague, J. E. and Nichols, D. E. (1995) Inhibition of MAO-B protects against MDMA-induced neurotoxicity in the striatum. *Psychopharmacology* 118, 357-359.
- (155) Sprague, J. E., Everman, S. L. and Nichols, D. E. (1998) An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neurotoxicology* 19, 427-442.
- (156) Wink, D. A., Nims, R. W., Saavedra, J. E., Utermahlen, W. E. and Ford, P. C. (1994) The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6604-6608.
- (157) Yuan, J., Callahan, B. T., McCann, U. D. and Ricaurte, G. A. (2001) Evidence against an essential role of endogenous brain dopamine in

- methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *Journal of neurochemistry* 77, 1338-1347.
- (158) Yuan, J., Cord, B. J., McCann, U. D., Callahan, B. T. and Ricaurte, G. A. (2002) Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity. *Journal of neurochemistry* 80, 960-969.
- (159) Schmidt, C. J. and Taylor, V. L. (1988) Direct central effects of acute methylenedioxymethamphetamine on serotonergic neurons. *European journal of pharmacology* 156, 121-131.
- (160) Kreth, K.-P., Kovar, K.-A., Schwab, M. and Zanger, U. M. (2000) Identification of the Human Cytochromes P450 Involved in the Oxidative Metabolism of "Ecstasy"-Related Designer Drugs. *Biochemical Pharmacology* 59, 1563-1571.
- (161) Kumagai, Y., Lin, L. Y., Schmitz, D. A. and Cho, A. K. (1991) Hydroxyl Radical Mediated Demethylenation of (Methylenedioxy)phenyl compounds. *Chemical research in toxicology* 4, 330-334.
- (162) Hiramatsu, M., Kumagai, Y., Unger, S. E. and Cho, A. K. (1990) Metabolism of Methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its aglutathione adducts. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 254, 521-527.
- (163) Patel, N., Kumagai, Y., Unger, S. E., Fukuto, J. M. and Cho, A. K. (1991) Transformation of dopamine and alpha-methyldopamine by NG108-15 cells: formation of thiol adducts. *Chemical research in toxicology* 4, 421-426.
- (164) Miller, R. T., Lau, S. S. and Monks, T. J. (1997) 2,5-bis-(Glutathion-S-yl)- α -methyldopamine, a putative metabolite of \pm -3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations. *European Journal of Pharmacology* 323, 173-180.
- (165) Bai, F., Jones, D. C., Lau, S. S. and Monks, T. J. (2001) Serotonergic neurotoxicity of 3,4-(+/-)-methylenedioxyamphetamine and 3,4-(+/-)-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) is potencionated by inhibition of

- gamma.glutamyl transpeptidase. *Chemical research in toxicology* 14, 863-870.
- (166) Capela, J. P., Meisel, A., Abreu, A. R., Branco, P. S., Ferreira, L. M., Lobo, A. M., Remião, F., Bastos, M. L. and Carvalho, F. (2005) Neurotoxicity of ecstasy metabolites in rat cortical neurons, and influence of hyperthermia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316, 53-61.
- (167) Monks, T. J. and Lau, S. S. (1994) Glutathione conjugation as a mechanism for the transport of reactive metabolites. *Advances in pharmacology* 27, 83-210.
- (168) vanBladeren, P. J. (2000) Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-Biological Interactions* 129.
- (169) Bai, F., Lau, S. S. and Monks, T. J. (1999) Glutathione and N-acetylcysteine conjugates of α -methyldopamine produce serotonergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxymphetamine-mediated neurotoxicity. *Chemical research in toxicology* 12, 1150-1157.
- (170) Wolff, J. E. A., Belloni-Olivi, L., Bressler, J. P. and Goldstein, G. W. (1992) γ -Glutamyl-transpeptidase activity in brain microvessels exhibits regional heterogeneity. *Journal of neurochemistry* 58, 909-915.
- (171) Dykhuizen, R. S., Brunt, P. W., Atkinson, P., Simpson, J. G. and Smith, C. C. (1995) Ecstasy induced hepatitis mimicking viral hepatitis. *Gut* 36, 934-941.
- (172) Ellis, A., Wendon, J., Portmann, B. and Williams, R. (1996) Acute liver damage and ecstasy ingestion. *Gut* 38, 454-458.
- (173) Núñez, O., Bañares, R., Barrio, J., Menchén, L., Diego, A., Salinero, E. and Clemente, G. (2002) Variabilidad de la expresión de la toxicidad hepática por éxtasis. *European journal of gastroenterology & hepatology* 25, 497-500.
- (174) Henry, J. A., Jeffreys, K. J. and Dawling, S. (1992) Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Lancet* 340, 384-387.
- (175) Coore, J. R. (1996) A fatal trip with ecstasy: a case of 3,4-methylenedioxymethamphetamine/3,4-methylenedioxymphetamine toxicity. *Journal of the Royal Society of Medicine* 89, 51-52.

- (176) Milroy, C. M., Clark, J. C. and Forrest, A. R. W. (1996) Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. *Journal of clinical pathology* 49, 149-153.
- (177) Brauer, R. B., Heidecke, C. D., Nathrath, W., Beckurts, K. T. E., Vorwald, P., Zilker, T. R., Schweigart, U., Holscher, A. H. and Siewert, J. R. (1997) Liver transplantation for the treatment of fulminant hepatic failure induced by the ingestion of ecstasy. *Transplant international* 10, 229-233.
- (178) Andreu, V., Mas, A., Bruguera, M., Salmerón, J. M., Moreno, V., Nogué, S. and Rodé s, J. (1998) Ecstasy: a common cause of severe acute hepatotoxicity. *Journal of hepatology* 29, 394-397
- (179) Losser, M. R. and Payen, D. (1996) Mechanisms of liver damage. *Biological Mass Spectrometry* 22, 403-411.
- (180) Sies, H. and Graf, P. (1985) Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenilephrine and adrenaline. *The Biochemical journal*. 226, 545-549.
- (181) James, R. C., Roberts, S. M. and Harbison, R. D. (1983) Perturbation of hepatic glutathione by α 2-adrenergic agonists. *Fundamental and applied toxicology* 3, 303-308.
- (182) Taylor, W. M., Reinhart, P. H. and Bygrave, F. L. (1983) Stimulation of α -adrenérgic agonists of Ca^{2+} fluxes, mitochondrial oxidation and gluconeogenesis in perfused rat liver. *The Biochemical journal* 212, 555-565.
- (183) Leonardi, E. T. and Azmitia, E. C. (1994) MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and MAO type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology* 10, 231-238.
- (184) Beitia, G., Cobreros, A., Sainz, L. and Cenarruzabeitia, E. (1999) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)-induced hepatotoxicity: effect on cytosolic calcium signals in isolate hepatocytes. *Liver* 19, 234-241.
- (185) Carvalho, M., Carvalho, F., Remião, F., Pereira, M. L., Pires-das-Neves, R. and Bastos, M. L. (2002) Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body temperature and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. *Archives of toxicology* 76, 166-172.

- (186) Carvalho, M., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (2001) Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes. *Archives of toxicology* 74, 789-793.
- (187) Carvalho, M., Remião, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (2004) The toxicity of N-methyl- α -methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-acetylcysteine. *Toxicology*, 193-203.
- (188) Carvalho, M., Milhazes, N., Remião, F., Borges, F., Fernandes, E., Amado, F., Monks, T. J., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (2004) Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine and α -methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. *Archives of toxicology* 78, 16-24.
- (189) Carvalho, M., Hawksworth, G., Milhazes, N., Borges, F., Monks, T. J., Fernandes, E., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (2002) Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an in vitro study using rat and human renal proximal tubular cells. *Archives of toxicology* 76, 581-588.
- (190) Easton, N., Fry, J., O'Shea, E., Watkins, A., Kingston, S. and Marsden, C. A. (2003) Synthesis, in vitro formation, and behavioural effects of glutathione regioisomers of alpha-methyldopamine with relevance to MDA and MDMA (ecstasy). *Brain Research* 987, 144-154.
- (191) Carvalho, M., Remião, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Monteiro, M. d. C., Gonçalves, M. J., Seabra, V., Amado, F., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (2004) Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro. *Chemical Research in Toxicology* 17, 623-632.
- (192) Skibba, J., Powers, R. H., Stadnicka, A., Cullinane, D. W., Almagro, U. A. and Kalbfleisch, J. H. (1991) Oxidative stress as a precursor to the irreversible hepatocellular injury caused by hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 5, 749-761.
- (193) Wills, E. J., Findlay, J. M. and McManus, J. P. A. (1976) Effects of Hyperthermia therapy on the liver. *Journal of clinical pathology* 29, 1-10.

- (194) Carvalho, F., Remião, F., Soares, M. E., Catarino, R., Queiroz, G. and Bastos, M. L. (1997) *d*-Amphetamine-induced hepatotoxicity: possible contribution of catecholamines and hyperthermia to the effect studied in isolated rat hepatocytes. *Archives of Toxicology* 71, 429-436.
- (195) Montiel-Duarte, C., Varela-Rey, M., Oses-Prieto, J., Lopez-Zabalza, M., Beitia, G., Cenarruzabeitia, E. and Iraburu, M. (2002) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") induces apoptosis of cultured rat liver cells. *Biochimica et biophysica acta* 1588, 26-32.
- (196) Montiel-Duarte, C., Ansorena, E., Lopez-Zabalza, M., Cenarruzabeitia, E. and Iraburu, M. (2004) Role of reactive oxygen species, glutathione and NF-KB in apoptosis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on hepatic stellate cells. *Biochemical pharmacology* 67, 1025-1033.
- (197) Fahal, I. H., Sallomi, D. F., Yaqoob, M. and Bell, G. M. (1992) Acute renal failure after ecstasy. *BMJ (Clinical research ed.)* 305, 29.
- (198) Woodrow, G., Harnden, P. and Turney, J. H. (1995) Acute renal failure due to accelerated hypertension following ingestion of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Nephrology, dialysis, transplantation* 10, 399-400.
- (199) Cunningham, M. (1997) Ecstasy-induced rhabdomyolysis and its role in the development of acute renal failure. *Intensive & critical care nursing* 13, 216-223.
- (200) Bingham, C., Beaman, M., Nicholls, A. and Anthony, P. (1998) Necrotizing renal vasculopathy resulting in chronic renal failure after ingestion of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Nephrology, dialysis, transplantation* 13, 2654-2655.
- (201) Walubo, A. and Seger, D. (1999) Fatal multi-organ failure after suicidal overdose with MDMA, "ecstasy": case report and review of the literature. *Human & experimental toxicology* 18, 119-125.
- (202) Citron, B. P., Halpern, M., McCarron, M., Lundberg, G. D., McCormick, R., Pincus, I. J., Tatter, D. and Haverback, B. J. (1970) Necrotizing angitis

- associated with drug abuse. *The New England journal of medicine* 283, 1003-1011.
- (203) Kwon, C., Zaritsky, A. and Dharnidharka, V. R. (2003) Transient proximal tubular renal injury following ecstasy ingestion. *Pediatr Nephrol* 18, 820-822.
- (204) Boogaard, P. J., Nagelkerke, J. F. and Mulder, G. J. (1990) Renal proximal tubular cells in suspension or in primary culture as in vitro models to study nephrotoxicity. *Chemico-biological interactions* 76, 251-291.
- (205) Schaaf, G. J., Groene, E. M., Maas, R. F., Commandeur, J. N. and Fink-Gremmels, J. (2001) Characterization of biotransformation enzyme activities in primary rat proximal tubular cells. *Chemico-biological interactions* 134, 167-190.
- (206) Lau, S. (1995) Quinone-thioether-mediated nephrotoxicity. *Drug metabolism reviews* 27, 125-141.
- (207) Monks, T., Rivera, M., Mertens, J., Peters, M. and Lau, S. (1996) The kidney as a target for biological reactive metabolites: linking metabolism to toxicity. *Advances in experimental medicine and biology* 387, 203-212.
- (208) Bladeren, P. J. v. (2000) Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-biological interactions* 129, 61-76.
- (209) Monks, T. J. (1995) Modulation of quinol/quinone-thioether toxicity by intramolecular detoxication. *Drug metabolism reviews* 27, 93-106.
- (210) Cheng, F. C., Kuo, J. S. and Dryhurst, G. (1996) Elevated 5-S-cysteinyldopamine/homovanillic acid ratio and reduced homovanillic acid in cerebrospinal fluid: possible markers for and potential insights into the pathoetiology of Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* 103, 433-446.
- (211) Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (2001a) Cardiotoxicity studies using freshly isolated calcium-tolerant cardiomyocytes from adult rat. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 37, 1-4.
- (212) Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F. and Bastos, M. L. (2001c) The study of oxidative stress in freshly isolated Ca^{2+} -tolerant cardiomyocytes from the adult rat. *Toxicology in Vitro* 15, 283-287.

- (213) Dagnino-Subiabre, A., Cassels, B. K., Baez, S., Johansson, A.-S., Mannervik, B. and Segura-Aguilar, J. (2000) Glutathione Transferase M2-2 Catalyzes Conjugation of Dopamine and Dopa o-Quinones. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 274, 32–36.
- (214) Magnay, J. L., Tong, J., Drangova, R. and Baines, A. D. (2001) Production of cysteinyl-dopamine during intravenous dopamine therapy. *Kidney International* 59 1891-1898.
- (215) Eisenhofer, G., Goldstein, D. S., Stuli, R., Kelser, H. R., Sunderland, T., Murphy, D. L. and Kopin, I. J. (1986) Simultaneous Liquid-Chromatographic Determination of 3,4-Dihydroxyphenylglycol, Catecholamines, and 3,4-Dihydroxyphenylalanine in Plasma, and Their Responses to Inhibition of Monoamine Oxidase. *Clinical Chemistry* 32, 2030-2033.
- (216) Eisenhofer, G., Rundquist, B., Aneman, A., Friberg, P., Dakak, N., Kopin, I. J., Jacobs, M.-C. and Lenders, J. W. M. (1995) Regional Release and Removal of Catecholamines and Extraneuronal Metabolism to Metanephrines. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80, 3009-3017.
- (217) Eisenhofer, G., Keiser, H., Friberg, P., Mezey, E., Huynh, T.-T., Hiremagalur, B., Ellingson, T., Duddempudi, S., Eijssbout, A. and Lenders, J. W. M. (1998) Plasma Metanephrines Are Markers of Pheochromocytoma Produced by Catechol- O-Methyltransferase Within Tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 33, 2175-2185.
- (218) Goldstein, D. S., Stull, R., Zimlichman, R., Levinson, P. D., Smmth, H. and Keiser, H. R. (1984) Simultaneous Measurement of DOPA, DOPAC, and Catecholamines in Plasma by Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Clinical Chemistry* 30, 815-816.
- (219) Goldstein, D. S., Stull, R., Eisenhofer, G., Sisson, J. C., Weder, A., Averbuch, S. D. and Keiser, H. R. (1986) Plasma 3,4-Dihydroxyphenylalanine (Dopa) and catecholamines in neuroblastoma or pheochromocytoma. *Annals of Internal Medicine* 105, 887-888.
- (220) Goldstein, D. S., Eisenhofer, G., Stull, R., Folio, C. J., Keiser, H. R. and Kopin, I. J. (1988) Plasma Dihydroxyphenylglycol and the Intraneuronal

- Disposition of Norepinephrine in Humans. *The Journal of Clinical Investigation, Inc.* 81, 213-220.
- (221) Candiotot, M., Bree, F. and Krstulovid, A. M. (1996) Plasma Catecholamine Assays: Calibration with Spiked Plasma Versus Aqueous Solutions. *Biomedical Chromatography* 10, 40-42.
- (222) Davis, G. C. and Kissinger, P. T. (1981) Strategies for Determination of Serum or Plasma Norepinephrine by Reverse-Phase Liquid Chromatography. *Analytical chemistry* 53, 156-159.
- (223) Remião, F., Milhazes, N., Borges, F., Carvalho, F., Bastos, M. L., Lemos-Amado, F., Domingues, P. and Ferrer-Correia, A. (2003) Synthesis and analysis of aminochromes by HPLC-photodiode array. Adrenochrome evaluation in rat blood. *Biomedical Chromatography* 17, 6-13.
- (224) Núñez-Delicado, E., Pérez-Gilabert, M., Sánchez-Ferrer, A. and García-Carmona, F. (1996) Hydroperoxidase activity of lipoxygenase: a kinetic study of isoproterenol oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1293, 17-22.
- (225) Riobó, N. A., Schopfer, F. J., Boveris, A. D., Cadenas, E. and Poderoso, J. J. (2002) The reaction of nitric oxide with 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 32, 115-121.
- (226) Land, E. J., Ramsden, C. A. and Rile, P. A. (2003) Tyrosinase Autoactivation and the Chemistry of ortho-Quinone Amines. *Accounts of chemical research* 36, 300-308.
- (227) Greggio, E., Bergantino, E., Carter, D., Ahmad, R., Costin, G.-E., Hearing, V. J., Clarimon, J., Singleton, A., Eerola, J., Hellström, O., Tienari, P. J., Miller, D. W., Beilina, A., Bubacco, L. and Cookson, M. R. (2005) Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 93.
- (228) Zhang, F. and Dryhurst, G. (1995) Influence of glutathione on the oxidation chemistry of the catecholaminergic neurotransmitter dopamine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 398.
- (229) Kummert, R. and Stumm, W. (1980) The surface complexation of organic acids on hydrous γ - Al_2O_3 . *Journal of colloid and interface science* 75, 373.

- (230) Goldstein, D. S., Eisenhofer, G. and Kopin, I. J. (2003) Sources and Significance of Plasma Levels of Catechols and Their Metabolites in Humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 305, 800-811.
- (231) Lenders, J. W. M., Eisenhofer, G., Armando, I., Keiser, H. R., Goldstein, D. S. and Kopin, I. J. (1993) Determination of Metanephrines in Plasma by LiquidChromatography with Electrochemical Detection. *Clinical Chemistry* 39, 97-103.
- (232) Lenders, J. W. M., Keiser, H. R., Goldstein, D. S., Willemsen, J. L., Friberg, P., Jacobs, M.-C., Kloppenborg, P. W. C., Thien, T. and Eisenhofer, G. (1995) Plasma metanephrines in the diagnosis of Pheochromocytoma. *Annals of Internal Medicine* 123, 101-109.
- (233) Pani, A. K. and Croll, R. P. (2000) Catechol Concentrations in the Hemolymph of the Scallop, *Placopecten magellanicus*. *General and Comparative Endocrinology* 118, 48-56.
- (234) Eldrup, E. (2004) Significance and origin of DOPA, DOPAC, and dopamine-sulphate in plasma, tissues and cerebrospinal fluid. *Danish Medical Bulletin* 51, 34-62.
- (235) Causon, R. C. and Carruthers, M. E. (1982) Measurement of catecholamines in biological fluids by high-performance liquid chromatography: a comparison of fluorimetric with electrochemical detection. *Journal of chromatography* 229, 301-309.
- (236) Wachtel, S. R., Bencsics, C. and Kang, U. J. (1997) Role of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase for Dopamine Replacement by Genetically Modified Fibroblasts in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry* 69, 2055-2063.
- (237) Isimer, A., Basci, N. E., Bozkurt, A. and Kayaalp, S. O. (1991) Effects of mobile phase composition on the separation of catecholamines by liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 4, 130-135.

- (238) Gil, M. C., Aguirre, J. A., Lemoine, A. P., Segura, E. T., Barontini, M. and Armando, I. (1999) Influence of Age on Stress Responses to Metabolic Cage Housing in Rats. *Cellular and Molecular Neurobiology* 19, 625-633.
- (239) Verrico, C. D., Jentsch, J. D. and Roth, R. H. (2003) Persistent and Anatomically Selective Reduction in Prefrontal Cortical Dopamine Metabolism After Repeated, Intermittent Cannabinoid Administration to Rats. *Synapse* 49, 61-66.
- (240) Goldstein, D. S., G, G. F., Izzo, J. L., Kopin, L. I. and Keiser, H. R. (1981) Validity and reliability of liquid chromatography with electrochemical detection for measuring plasma levels of norepinephrine and epinephrine in man. *Life Sciences* 28, 467-475.
- (241) Capaldo, B., Lembo, G., Rendina, V., Guida, R., Marzullo, P., Colao, A., Lombardi, G. and Sacca, L. (2000) Muscle Sympathetic Nerve Activity in Patients with Acromegaly. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85, 3203-3207.
- (242) Byrne, D. (2002) Decisão da Comissão de 12 de Agosto de 2002 - Critérios de desempenho e outros requisitos e procedimentos aplicáveis aos métodos analíticos, *In Jornal Oficial das Comunidades Europeias* pp 8-36.
- (243) Holmes, C., Eisenhofer, G. and Goldstein, D. S. (1994) Improved assay for plasma dihydroxyphenyl-acetic acid and other catechols using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatography* 653, 131-138.
- (244) Thompson, M., Ellison, S. L. R. and Wood, R. (2002) Harmonized guidelines for single laboratory Validation of methods of Analysis. *Pure and applied chemistry* 74, 835-855.
- (245) Food and Drug Administration (FDA). (2001) Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation, pp 1-20, FDA.
- (246) Ferreira, C. F. and Ortiz, C. S. (2005) Simultaneous determination of bifonazole and tinctures of Calendula flower in Pharmaceutical creams by Reverse-Phase Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International* 88, 1649-1654.

- (247) Food and Drug Administration (FDA). (1999) Validation of Analytical Procedures: Defenition and Terminology, pp 1-8.
- (248) Food and Drug Administration (FDA). (1995) Guideline for Industry Text on Validation of Analytical Procedures, pp A1-A9, FDA.
- (249) Causon, R. (1997) Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: Viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B* 689, 175-180.
- (250) International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (1994) Text on Validation of Analytical Procedures Q2A, pp 1-7.
- (251) Goldstein, D. S., Spanarkel, M., Pitterman, A., Toltzis, R., Gratz, E., Epstein, S. and Keiser, H. R. (1982) Circulatory control mechanisms in vasodepressor syncope. *American heart journal* 104, 1071-1075.
- (252) Bravo, E. L. (2002) Pheochromocytoma. *Cardiology in Review* 10, 44-50.
- (253) Wheatley, A. M., Thandroyen, F. T. and Opie, L. H. (1985) Catecholamine-induced myocardial cell damage; catecholamines or adrenochrome. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 17, 349-359.
- (254) Raymondos, K., Panning, B., Leuwer, M., Brechelt, G., Korte, T., Niehaus, M., Tebbenjohanns, J. and Piepenbrock, S. (2000) Absorption and Hemodynamic Effects of Airway Administration of Adrenaline in Patients with Severe Cardiac Disease. *Annals of internal medicine* 132, 800-803.
- (255) Sulzer, D., Chen, T. K., Lau, Y. Y., Kristensen, H., Rayport, S. and Ewing, A. (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to cytosol and promotes reverse transport. *The Journal of neuroscience* 15, 4102-4108.
- (256) Easton, N., Fry, J., O'Shea, E., Watkins, A., Kingston, S., Marsden, C. A. (2003) Synthesis, in vitro formation, and behavioural effects of glutathione regioisomers of alpha-methyldopamine with relevance to MDA and MDMA (ecstasy). *Brain Research* 987, 144-154.